



# Rôle des Procaryotes dans la dynamique du nitrite dans la Seine

Thibaut Cazier

## ► To cite this version:

Thibaut Cazier. Rôle des Procaryotes dans la dynamique du nitrite dans la Seine. Microbiologie et Parasitologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066706 . tel-01392608

**HAL Id: tel-01392608**

**<https://theses.hal.science/tel-01392608>**

Submitted on 4 Nov 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Géoscience Ressources Naturelles et Environnement (ED 398)

*UMR 7619 METIS*

## **Rôle des Procaryotes dans la dynamique du nitrite dans la Seine**

Par Thibaut Cazier

Thèse de doctorat de microbiologie environnementale

Dirigée par Anniet Laverman, Josette Garnier et Céline Roose-Amsaleg

Présentée et soutenue publiquement le 16 Octobre 2015

Devant un jury composé de :

Servais Pierre, Professeur,

Rapporteur

Garabetian Frédéric, Professeur,

Rapporteur

Agogué Hélène, Chargée de recherche,

Examinatrice

Viollier Eric, Maître de conférences,

Examineur

Mouchel Jean-Marie, Professeur,

Examineur

Laverman Anniet, Chargée de recherche,

Directrice de thèse

Garnier Josette, Directrice de recherche,

Directrice de thèse

Roose-Amsaleg, Céline, Ingénieure de recherche,

co-Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Anaïs qui m'a supporté tout au long de cette thèse ainsi que pendant les années qui l'ont précédée. Tu as toujours cru en moi, même quand moi je n'y croyais plus. Tu as tout fait pour faciliter mon quotidien, et me permettre d'aller jusqu'au bout. Je tiens également à remercier Théodore et Anatole de m'avoir permis de m'évader avec eux, et surtout d'avoir dormi la nuit (dans la mesure du raisonnable). Vous donnez un sens à ce que je fais.

Je remercie ensuite mes parents, Lucette et Yves, qui ont pour grande partie fait de moi la personne que je suis. Je ne suis pas parfait, et encore moins normal, mais j'aime ma vie et je crois que c'est le principal. Je ne vais pas citer tout le reste de ma famille (très) nombreuse, autrement que pour dire qu'eux aussi ont participé à mon bonheur.

Je remercie également les personnes qui m'ont entouré au labo au cours de cette thèse. Anniet, Céline et Josette, merci de m'avoir encadré, même si ça n'a pas dû être facile tous les jours. Merci à toute l'équipe du labo ainsi qu'au personnel du SIAAP, qui m'ont aidé pour les manips et prélèvements. Je remercie également les doctorants et stagiaires qui ont rendu vivant le couloir 55-56.

Enfin merci à mes amis d'outre région (oui, je parle de la Normandie), qui m'ont permis de passer des soirées à penser à autre chose que la thèse, et des matinées à penser que j'aurais plutôt dû penser à ma thèse.

En résumé, je remercie toutes les personnes qui ont contribué à ma thèse, que ce soit directement (en travaillant avec moi) ou indirectement (en existant tout simplement).

## Résumé

Le nitrite est un intermédiaire de nombreuses voies du cycle de l'azote, mais est toxique pour la plupart des formes de vies aquatiques. Sa toxicité agit au niveau cellulaire pour tous les organismes, et au niveau de la respiration pour les organismes complexes. Il est généralement supposé que ce composé est éliminé rapidement dans l'environnement, et que les Procaryotes responsables de son élimination sont efficaces. Cependant les concentrations de nitrite dépassent la norme européenne (0,7  $\mu\text{M}$ ) dans la Seine entre Paris et l'estuaire. Le nitrite est apporté dans la Seine en aval de Paris par la station d'épuration (STEP) Seine Aval (SAV), malgré l'ajout de traitements d'élimination de l'azote (nitrification et dénitrification). En plus des composantes chimique et organique, les eaux de sorties de STEP contiennent des Procaryotes qui peuvent coloniser l'environnement. Dans la colonne d'eau, les mesures de cinétique de nitrification ont montré que les oxydants du nitrite avaient une activité potentielle plus élevée que les oxydants de l'ammonium. De plus, l'estimation du nombre de copies des gènes indicateurs des Procaryotes nitrifiants par qPCR a montré que les oxydants du nitrite (*Nitrobacter* dans la Seine et *Nitrospira* dans les rejets de STEP) étaient plus abondants que les oxydants de l'ammonium. Malgré des taux potentiels élevés d'oxydation du nitrite, les taux *in situ* d'oxydation du nitrite étaient similaires aux taux *in situ* d'oxydation de l'ammonium dans la Seine. Cet équilibre entre production du nitrite (oxydation de l'ammonium) et élimination du nitrite (oxydation du nitrite) résulte en une très lente élimination du nitrite dans la colonne d'eau. Les hypothèses pouvant expliquer la faible efficacité de l'oxydation du nitrite seraient une inhibition des Procaryotes oxydant le nitrite par des polluants présents en Seine, ou le basculement de leur métabolisme vers un comportement mixotrophe de ces oxydants du nitrite, voire une limitation du substrat. En plus de l'impact significatif sur la concentration du nitrite dans la colonne d'eau, les STEP influencent la composition et la distribution des Procaryotes présents dans le sédiment et la colonne d'eau. Il est apparu que les communautés microbiennes du sédiment étaient fortement influencées par les rejets de STEP, dominées par les bactéries du genre *Nitrospira* apporté par les effluents. Le sédiment a été observé être tant une source de nitrite pour la colonne d'eau, qu'un puit de nitrites bien que les taux soient très faibles par rapport aux rejets des STEP. Le nitrite était produit en conditions anoxiques (profondeur 3-4 cm) en amont de la STEP, et en surface (0-1 cm) en aval de la STEP.

## Abstract

Nitrite is an intermediate in many microbial pathways of the nitrogen cycle, but is also toxic for most form of aquatic life. It is toxic at a cellular level for all organisms, and for the respiration of complex organisms. In general the elimination of this compound is assumed to be fast in the environment, and the Prokaryotes responsible efficient. In the Seine River however, nitrite concentrations exceed the European norm of 0.7  $\mu\text{M}$  between Paris and the estuary. The nitrite is released in the Seine River downstream of Paris by the waste water treatment plants (WWTP) Seine Aval (SAV) despite the addition of nitrogen removal treatments (nitrification and denitrification). In addition chemical compounds and organic matter, the WWTP outlets also contain Prokaryotes which can colonize the environment. In the water column, measurements of nitrification kinetics showed that nitrite oxidizers had a higher potential activity than ammonia oxidizers. Quantification of nitrifiers by qPCR showed that nitrite oxidizers, *Nitrobacter* in the environment and *Nitrospira* in the WWTP outlets were more abundant than ammonia oxidizers. Despite high potential for nitrite oxidation, *in situ* nitrite oxidation rates were similar to ammonia oxidation rates in the Seine River. This balance between nitrite production (ammonia oxidation) and elimination (nitrite oxidation) results in a very slow elimination of nitrite in the water column. It is hypothesized that low nitrite oxidizing efficiency was caused by either inhibition by pollutants in the Seine River, or due to mixotrophic metabolism by nitrite oxidizers, or even limitation in substrate. In addition to the significant impact on nitrite levels in the water column, the WWTP had a significant impact on the composition and distribution of the Prokaryotes present in the water column and sediment. It appears that the benthic microbial communities were highly influenced by the WWTP outlets, and were colonized by the *Nitrospira* genera which dominated the microbial communities in the effluents. The sediment compartment showed to be either a source or a well of nitrite for the water column of the Seine River, even though the rates of production were low in October 2013 compared to the release by the WWTP outlet. Nitrite was produced in the anoxic zone upstream of the WWTP (at a depth of 3-4 cm) whereas it was produced near the surface downstream of the WWTP (0-1 cm).



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction, matériel et méthodes</b>	<b>11</b>
	I. Introduction	13
	I.1. Activités humaines et pollutions	14
	I.2. Les Procaryotes et leur rôle : le cycle de l'azote	17
	I.2.1. Généralités	18
	I.2.2. Nitrification	19
	I.2.3. Dénitrification	21
	I.2.4. Anammox	22
	I.2.5. Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA)	23
	I.2.6. Le nitrite	24
	I.3. Objectifs	25
	II. Matériel et Méthodes	27
	II.1. Site d'étude et prélèvement	27
	II.2. Prétraitement des échantillons	29
	II.3. Analyses physique et chimique	31
	II.4. Calculs de similarité de communautés par DGGE	32
	II.5. Quantification de gènes d'intérêt par qPCR	36
	II.6. Spécificité et pertinence des amorces	37
	II.7. Mesure des taux de nitrification dans la colonne d'eau	39
	II.8. Etude des flux benthiques de nitrite	41
	II.9. Profils dans le sédiment	41
<b>2</b>	<b>Le rôle du sédiment dans la dynamique du nitrite dans la Seine</b>	<b>43</b>
	I. Introduction	45
	II. Matériel et méthodes	48
	II.1. Site d'étude et prélèvement	48



II.2.	Prétraitement des échantillons et analyses chimiques	49
II.3.	Flux benthique de nitrite	50
II.4.	Quantification des gènes d'intérêt	50
II.5.	Tests statistiques	52
III.	Résultats	53
III.1.	Caractéristiques physico-chimiques du sédiment	53
III.2.	Flux de nitrites à l'interface sédiment-eau et profil des formes de l'azote	54
III.3.	Communautés microbiennes du sédiment	58
III.3.1.	L'ensemble des communautés microbiennes.	58
III.3.2.	Les communautés microbiennes nitrifiantes.	59
III.3.3.	Les communautés microbiennes dénitrifiantes et DNRA.	60
IV.	Discussion	61
<b>3</b>	<b>Rôle de la colonne d'eau dans la dynamique du nitrite dans la Seine</b>	<b>69</b>
A.	Cinétique de la nitrification et persistance du nitrite dans la Seine	71
I.	Introduction	75
II.	Methodology	78
II.1.	Study site	78
II.2.	Sampling design	78
II.3.	Measurement of ammonia and nitrite oxidation rates	79
II.4.	Laboratory analyses	81
II.5.	Statistics	81
III.	Results	82
III.1.	Environmental variables along the Seine River	82
III.2.	Nitrification kinetics	83
III.3.	In situ rates of nitrite production and consumption	87

III.4. Seasonal budgets	88
IV. Discussion	89
IV.1. Anthropogenic sources of nitrite	89
IV.2. Persistence of nitrite in riverine waters	90
IV.3. Nitrification kinetics of riverine microbial communities	92
IV.4. Implications for river water quality modelling and management	95
V. Conclusions	96
B. Analyse de la diversité microbienne dans la colonne d'eau	103
I. Introduction	105
II. Méthodologie	107
II.1. Site d'étude	107
II.2. Extraction de l'ADN	108
II.3. Etude de la diversité	108
II.4. Tests statistiques	109
III. Résultats	110
III.1. Conditions environnementales	110
III.2. Variation temporelle de la diversité des Bactéries	112
III.3. Variations spatiales de la diversité des Procaryotes	113
IV. Discussion	116
C. Les Procaryotes impliqués dans la dynamique du nitrite dans la colonne d'eau dans la Seine	119
I. Introduction	123
II. Material and methods	126
II.1. Sampling sites, samples collection and analysis	126
II.2. DNA extraction and molecular analysis	128
II.3. Statistical analysis	129

III.	Results	131
III.1.	Environmental variables	131
III.2.	Microbial abundance in the water column and WWTP outlet	133
III.3.	Microbial abundance related to seasonal and environmental factors	137
IV.	Discussion	138
V.	Conclusions	143
VI.	Material and methods	151
VI.1.	Comparison qPCR 16S versus NxrA Nitrobacter	151
VI.2.	Impact of plasmid linearization on qPCR calculus	151
VI.3.	Nitrite oxidation in environmental or controlled conditions	152
VI.4.	Results and discussion	152
<b>4</b>	<b>Discussion et perspectives</b>	<b>159</b>
I.	Discussion : dynamique du nitrite en Seine et Procaryotes associés	161
I.1.	Dynamique du nitrite dans la Seine	162
I.2.	Les communautés de Procaryotes impliquées dans le cycle de l'azote	165
I.3.	Fonctionnement écologique du secteur parisien de la Seine : nitrite et pollutions diverses	167
II.	Perspectives	169
<b>5</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>171</b>
<b>6</b>	<b>Annexe</b>	<b>189</b>
<b>7</b>	<b>Table des Illustrations</b>	<b>199</b>
<b>8</b>	<b>Table des Tableaux</b>	<b>207</b>

## 1 Introduction, matériel et méthodes

---



## I. Introduction

Les procaryotes sont omniprésents sur terre, et l'activité dans un environnement donné est dépendante des organismes qui composent la communauté microbienne (Schneider et al., 2007). Les associations symbiotiques des microorganismes dans l'environnement (procaryotes et eucaryotes) en font des acteurs majeurs des cycles biogéochimiques de l'environnement (Gadd, 2010). Les interactions microbes-métaux-minéraux sont essentielles pour l'assimilation des minéraux et métaux, notamment pour les phases précoces de la formation du sol et du sédiment (Gadd, 2010). Les microorganismes sont donc à la base des cycles biogéochimiques, et continuent à être des acteurs importants de la dynamique environnementale, à toutes les étapes de ces cycles. Or, le fonctionnement environnemental est une préoccupation qui prend une place de plus en plus importante pour l'espèce humaine, au niveau individuel comme international.

Une question « environnementale » majeure est de savoir si l'homme risque de perturber l'environnement à un point tel qu'il ne pourrait plus y prospérer. C'est dans ce cadre que le cycle de l'azote a été défini comme un enjeu majeur dans le « safe operating space for Humanity » (Rockstrom et al., 2009). Rockstrom et al. (2009) ont en effet estimé que l'humanité avait dépassé les critères pour trois des sept paramètres pour ce « safe operating space » : le changement climatique, le taux de disparition de la biodiversité, et le cycle de l'azote. Le cycle de l'azote est en effet fortement perturbé par l'Homme ce qui conduit à son accumulation dans de nombreux réservoirs (Galloway et al., 2004). Les rivières sont des sites importants du déroulement du cycle de l'azote et Galloway et al. (2004) estiment qu'environ 75% de l'azote réactif qui y entre est dénitrifié (avec cependant de fortes incertitudes autour de cette valeur théorique). L'excès d'azote réactif (par opposition au  $N_2$ ) apporté par l'homme est en augmentation constante depuis la révolution industrielle par deux mécanismes principaux : la production de nourriture (accumulation volontaire), et la production d'énergie (accumulation involontaire) (Galloway et al., 2004).

La pollution en azote des rivières est une conséquence directe des activités agricole et industrielle, activités humaines présentes sur leur bassin versant. La Seine (France) en est un exemple, et il a été observé que les stations d'épuration (STEP) étaient une source majeure d'azote réactif pour la Seine principalement sous forme ammonium, et que leur influence était observable jusqu'à l'estuaire avec une forte production de nitrite (Garnier et al., 2001, 2007). Des travaux y ont été conduits visant à faire un état des lieux de la nitrification de

l'ammonium en aval de Paris (Cébron et al., 2003, Cébron et al., 2004, Cébron, 2004). Parmi les formes de l'azote réactif, le nitrite est d'un intérêt particulier du fait de sa toxicité environnementale. Cette toxicité fait de la connaissance de la dynamique de cette forme de l'azote un enjeu important de l'amélioration du traitement des eaux usées, ainsi que du suivi de l'impact des STEP sur la Seine.

### **I.1. Activités humaines et pollutions**

La population humaine présente sur le bassin versant de la Seine s'élève à 17,25 millions, dont les deux tiers sont concentrés sur 2 % de sa surface, Paris et son agglomération. Dans le bassin de la Seine, outre Paris, les autres agglomérations majeures sont Le Havre, Reims et Rouen, qui comptent chacune plus de 150 000 habitants. Les densités de population varient beaucoup, allant de 35 à plus de 20 000 habitants par km<sup>2</sup>, ce qui conduit à une forte pression anthropique sur les rivières, dont certaines n'ont pas un débit suffisant pour supporter cette pression. Les eaux usées de 84 % de la population sont traitées en STEP, mais malgré ces traitements les eaux rejetées dans l'environnement perturbent les rivières et leur fonctionnement écologique. C'est pour cela que les traitements en STEP font l'objet d'amélioration, comme l'ajout de traitement de l'azote pour éliminer l'ammonium. Ces traitements sont mis en place car l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) peut être toxique dans sa forme non ionisée ammoniacale ( $\text{NH}_3$  aqueux) (Thurston et al., 1981) et que la nitrification dans la rivière conduit à la désoxygénation de l'eau, néfaste à la vie aquatique. L'occupation du sol du bassin versant de la Seine est dominée par des terres agricoles (Figure 1), représentant 60 % de sa surface ; 24 % sont des forêts (15 % de moyenne nationale), 5,9 % des zones humides et 10,1 % des zones urbanisées (rapport SDAGE Seine 2010/2015).

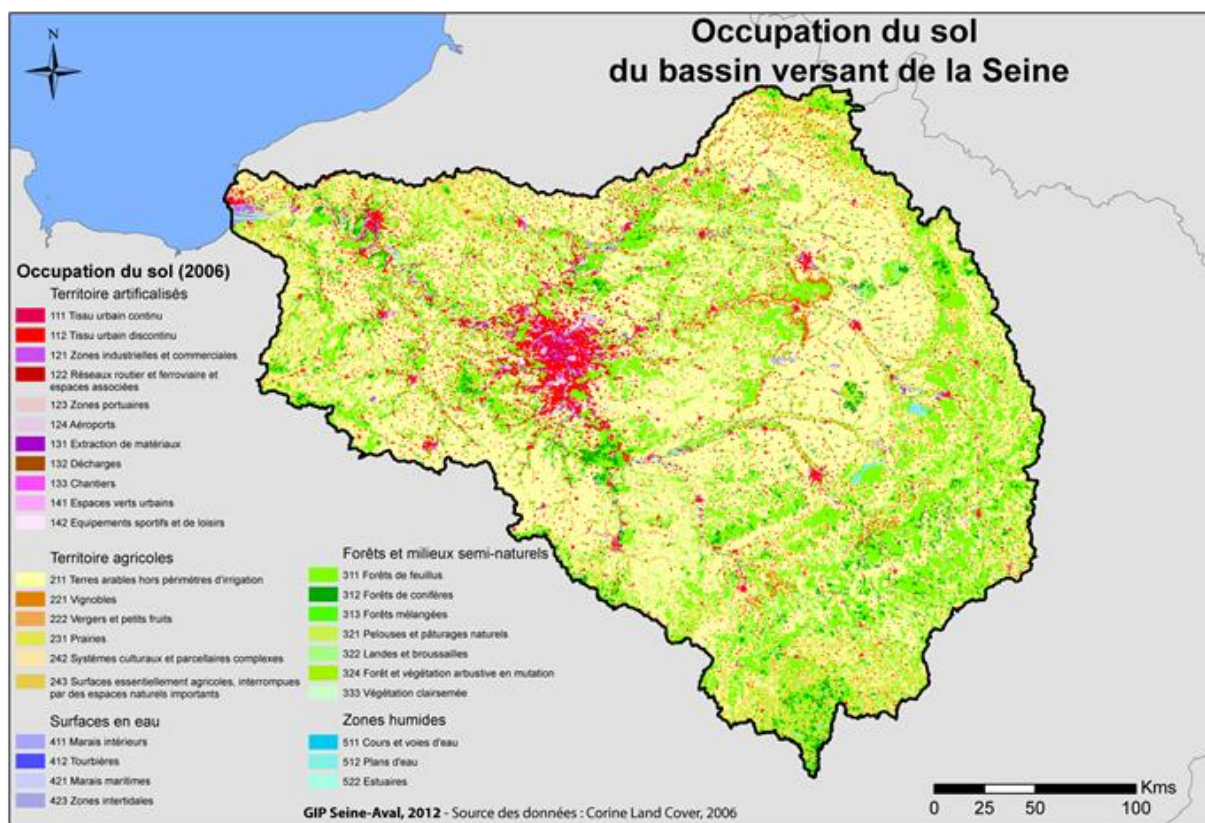


Figure 1 – Schéma d'occupation du sol du bassin versant de la Seine. (Source : seine-aval.crihan.fr)

Le bassin versant de la Seine est également le siège de 40 % des industries en France, qui bénéficient de la proximité des voies navigables pour le transport, mais aussi de grandes quantités d'eau pour la production. L'eau prélevée dans la rivière est principalement utilisée pour le refroidissement (85 % de l'eau prélevée). L'eau rejetée dans le milieu naturel a pu atteindre des records de températures de 10 à 15°C plus élevées que lors de son prélèvement (Merle, 1991), conduisant donc à un réchauffement local de la rivière. Cela modifie l'environnement, même en excluant les possibles contaminations chimiques ou biologiques. Le bassin versant de la Seine est aussi utilisé pour l'agriculture intensive (34 % de la production céréalière française), qui est une pression supplémentaire sur les ressources en eau. En hiver, 18 % des terres agricoles sont nues et représentent une source de pollution diffuse (voir Figure 2 pour les pollutions azotées, et Figure 3 pour les pollutions aux pesticides) par lessivage des sols (rapport SDAGE Seine 2010/2015).



Surplus d'azote calculés par zone hydrographique

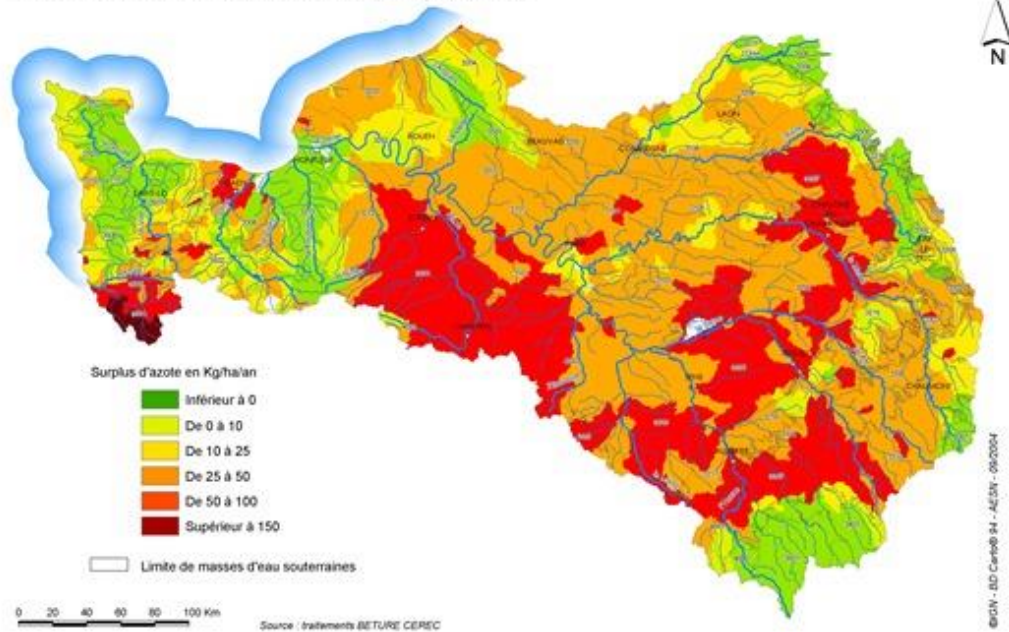


Figure 2- Carte des surplus azotés en kg/ha/an sur le bassin de la Seine en 2003 (source : eaufrance.fr)

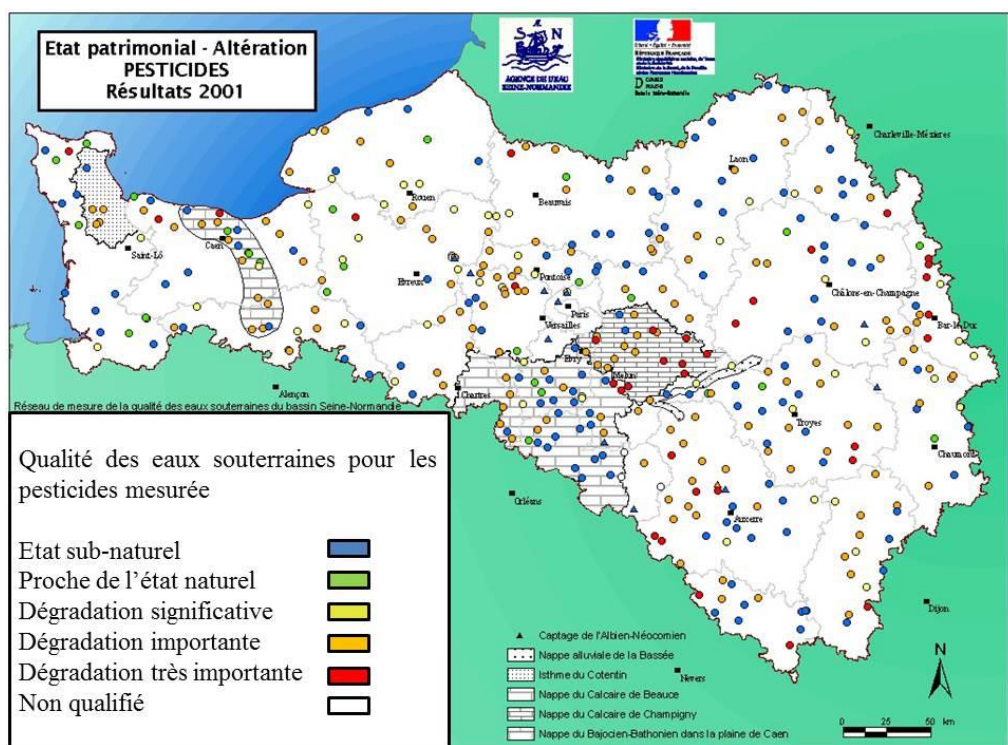


Figure 3- Carte de l'altération des eaux souterraines par les pesticides (source : eau-seine-normandie.fr)

L'activité agricole est la plus importante consommatrice nette d'eau dans le bassin de la Seine (Figure 4), et représente un prélèvement de 200 millions de m<sup>3</sup> par an, principalement en été. La consommation nette représente la quantité finale d'eau réellement extraite du milieu (eau prélevée moins eau rejetée).



Figure 4- Utilisation de l'eau dans le bassin de la Seine (source eau-Seine-normandie.fr). Prélèvement d'eau : volume prélevé. Consommation nette : volume prélevé – volume rejeté

Les pollutions induites par les activités humaines sont donc très diverses (e.g. métaux, nutriments, composés chimiques, microorganismes), avec des effets combinés largement méconnus et difficiles à appréhender. Cette méconnaissance est due aussi à la complexité de l'environnement, et aux interactions entre les différents acteurs du fonctionnement écologique (macro et microscopiques). La réponse la plus souvent adoptée par la société pour lutter contre les pollutions est la réglementation (au niveau national ou européen), ayant pour but de limiter les rejets. Les limites fixées sont le résultat d'un compromis entre les objectifs environnementaux et ceux des utilisateurs de la ressource notamment la capacité des industriels à diminuer leurs rejets.

## I.2. Les Procaryotes et leur rôle : le cycle de l'azote

Les cycles biogéochimiques sont classés en fonction de l'élément chimique concernés, par exemple le carbone, l'azote, le phosphore et la silice, pour ce qui concerne les nutriments. Ces cycles sont le résultat de transformations des éléments par voies abiotiques et biotiques. Procaryotes et Eucaryotes participent à ces transformations et les composés qui en sont issus, parfois nécessaires à un organisme peuvent être toxiques pour d'autres, voire pour lui-même en concentration trop importante. Les métabolites produits par un organisme peuvent également constituer une source de substrat pour un autre organisme. Ces éléments sont principalement rencontrés sous forme oxydée ou réduite à différents degrés, voire incorporés

dans des molécules biologiques. Les Procaryotes ont un rôle majeur dans la plupart de ces transformations, avec parfois l'étape cruciale d'assimilation des éléments présents sous forme minérale (cyanobactéries et autotrophes photo- et chimiolithotrophes produisent de matière organique, aux molécules souvent complexes) et celle de la minéralisation de cette matière organique (nombreuses bactéries notamment). Dans leur ensemble, les Procaryotes sont extrêmement résistants aux stress et résilients, ce qui leur permet de remplir leur rôle écologique dans des conditions *a priori* hostiles (*e.g.* températures extrêmes, fortes pollutions).

Les Procaryotes (Bactéries et Archées) sont nécessaires à la vie sur terre, et sont à la base de la plupart des cycles biogéochimiques. Ils sont par exemple indispensables au cycle de l'azote, les autres, Eucaryotes, étant incapables d'assimiler l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et de le rendre bio-disponible pour les réseaux trophiques. Cette étape d'assimilation est nécessaire car de nombreuses voies métaboliques du cycle de l'azote ont pour résultat final la minéralisation de l'azote organique.

### I.2.1. Généralités

L'azote est l'élément le plus abondant de notre atmosphère, le  $N_2$  gazeux représentant 80 % de l'air qui nous entoure. Cette forme de l'azote est inerte, et requiert les Procaryotes pour être assimilée. Toutes les étapes du cycle de l'azote n'ont pas lieu dans les mêmes environnements. La nitrification par exemple, consommatrice d'oxygène, a lieu en milieu oxygéné (comme la colonne d'eau d'une rivière) et est la transformation de l'ammonium ( $NH_4^+$ ) en nitrate ( $NO_3^-$ ) avec le nitrite ( $NO_2^-$ ) comme intermédiaire (Figure 5). La plupart des transformations de l'azote sont effectuées par les Procaryotes, et certaines formes intermédiaires du cycle de l'azote sont toxiques dans l'environnement. Par exemple, le nitrite ( $NO_2^-$ ) est toxique dans le milieu aquatique (pour les poissons ainsi que les Procaryotes), ce qui a conduit à l'introduction d'une norme au niveau Européen. Cette norme a été fixée à  $0,7 \mu M NO_2^-$  pour les eaux définies comme habitats pour les poissons (European-Council-Directive, 2006).

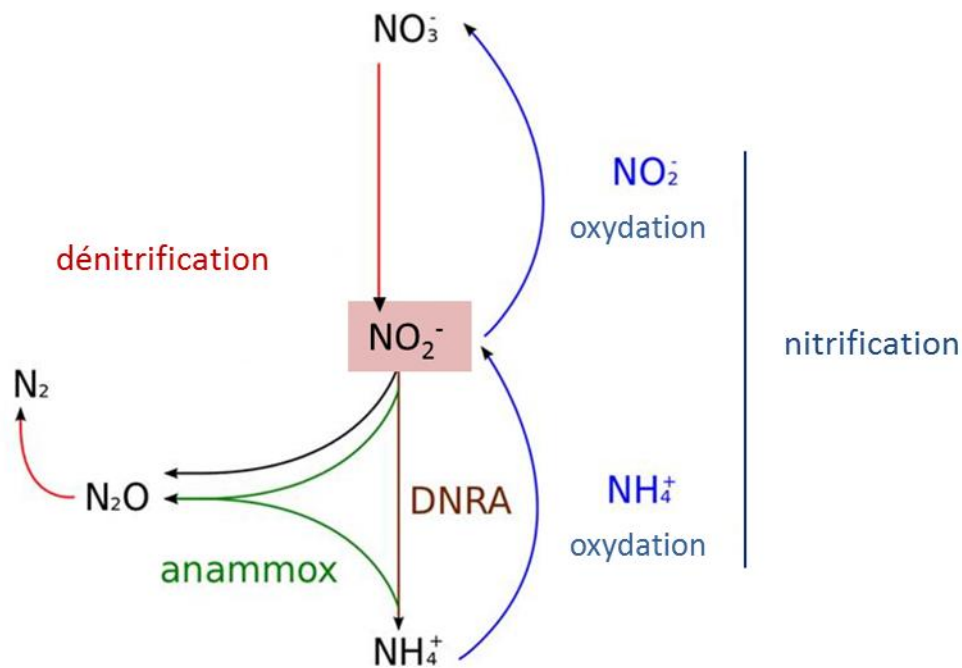


Figure 5- Cycle de l'azote simplifié, centré sur le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). Orga-N = azote organique ; DNRA = Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium ; anammox = oxydation anaérobie de l'ammonium

### I.2.2. Nitrification

La nitrification est une réaction dont le bilan général est la transformation par les Procaryotes de l'ammonium en nitrate, avec le nitrite comme intermédiaire (Figure 6). Les Procaryotes sont séparés en deux règnes distincts : les Bactéries, et les Archées. Ce sont deux règnes dont l'organisation cellulaire est similaire, ne possédant pas d'organites, mais qui sont phylogénétiquement très éloignés. En effet, des analyses génétiques suggèrent que les Archées sont plus proches des Eucaryotes que des Bactéries (Williams et al., 2013, Woese and Fox, 1977). Deux groupes microbiens très différents sont responsables des deux étapes de la nitrification. Les ammonium-oxydants (AO) transforment l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) avec l'hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) comme intermédiaire (Lees, 1952). Les nitrite-oxydants bactériens (NOB) sont les Procaryotes qui transforment le nitrite en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) (Spieck and Lipski, 2011). Les différences entre ces deux groupes font que la sensibilité aux stress environnementaux est différente entre AO et NOB. Les AO sont constitués des AO Archées (AOA) et AO Bactéries (AOB), mais les NO connus à l'heure actuelle sont uniquement des Bactéries (NOB).

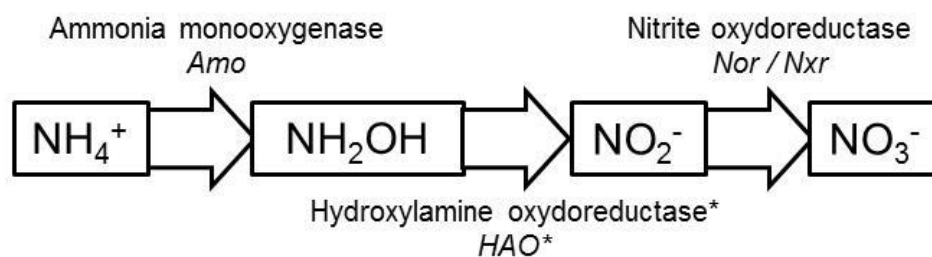


Figure 6 - Nitrification, enzymes et intermédiaires métaboliques

Les AOB sont principalement représentées par les genres *Nitrosomonas* et *Nitrosococcus* (Purkhold et al., 2000). Il existe à l'heure actuelle seulement 6 génomes complets d'AOA (NCBI), dont celui de la première souche AOA isolée, *Nitrososphaera gargensis* (Hatzenpichler et al., 2008). Le rapport AOB/AOA est variable, et dépend des conditions environnementales (Sonthiphand et al., 2013). Malgré des fonctions similaires, aucune évidence génétique n'a montré d'équivalent à l'enzyme bactérienne Hydroxylamine Oxydoréductase chez les AOA (Hallam et al., 2006). Il existe d'autres différences génétiques, les AOB pouvant disposer de deux à trois copies du gène de l'ammonia monooxygénase (*amoA*) (Junier et al., 2010). Un obstacle à l'exploration génétique des AOA est dû au fait que certaines Archées possèdent le gène *amoA* mais ne l'expriment pas (Mussmann et al., 2011).

A l'heure actuelle, cinq genres de NOB sont connus : *Nitrobacter* (Prosser, 1989), *Nitrospira* (Watson et al., 1986), *Nitrococcus* (Watson, 1971), *Nitrospina* (Watson, 1971) et *Nitrotoga* (Alawi et al., 2007). Ces genres peuvent être groupés de plusieurs façons, notamment sur la base de la structure de l'enzyme nitrite oxydoréductase (Nxr ou Nor). Chez *Nitrobacter* et *Nitrococcus*, cette enzyme est située sur la membrane intra-cytoplasmique de la bactérie (Sundermeyerklinger et al., 1984), et cette localisation permet à ces genres bactériens de supporter de plus fortes concentrations de nitrite (jusqu'à 29 000  $\mu\text{M}$ ) (Spieck and Lipski, 2011). Les trois autres genres de NOB (*Nitrospira*, *Nitrospina* et *Nitrotoga*) ont leur enzyme nitrite oxydoréductase sur le côté périplasmique de la membrane cytoplasmique. Cela leur permet de survivre dans des environnements plus pauvres en nitrite mais les rend sensibles à de fortes concentrations de nitrite (1 000  $\mu\text{M}$ ) (Spieck et al., 1998). Il n'y a pour l'instant aucune preuve d'Archée oxydant le nitrite, mais il est probable que ces organismes existent. De nombreux Procaryotes nitrifiants sont mixotrophes c'est-à-dire capables de croître de façon hétérotrophe ou autotrophe en conditions aérobies (Lucker et al., 2010, Mussmann et al., 2011, Tourna et al., 2011). Ils peuvent être trouvés dans de nombreux environnements

différents, et peuvent parfois se comporter comme des hétérotrophes suivant la disponibilité de matière organique. Les Procaryotes nitrifiants ont une croissance relativement lente en laboratoire, avec un temps de génération de 1 à 2 jours pour les AOB et NOB (Skinner and Walker, 1961). Ce temps de génération est donc probablement plus long dans l'environnement, où les conditions sont souvent loin d'être idéales. Il a été observé pour les AOA un temps de génération plus élevé que pour les AOB (French et al., 2012), mais dans des conditions limites, plus proches des conditions environnementales. Un temps de génération de 45 h pour *Nitrososphaera viennensis* dans les conditions optimales (Tournia et al., 2011) montre cependant un temps de génération similaire aux AOB et NOB. Il est probable que les temps de générations des différents groupes nitrifiants varient en fonction des environnements, qui pourraient encourager un comportement mixotrophe des nitrifiantes dans des conditions non favorables à la nitrification et en présence de matière organique.

### I.2.3. Dénitrification

L'azote oxydé sous forme nitrate peut être réduit en azote gazeux par la réaction de dénitrification (Figure 7). Cette partie du cycle de l'azote peut être prise en charge par un large panel de Procaryotes, Bactéries, Archées mais aussi des Eucaryotes comme les champignons et les foraminifères (Zumft, 1997), principalement des hétérotrophes. C'est une voie métabolique accessoire qui permet à des Procaryotes aérobies de vivre en anaérobiose, en utilisant les formes oxydées de l'azote comme accepteurs d'électrons (Zumft, 1997). Chez les Bactéries et les Archées, quatre enzymes sont en jeu (Zumft and Korner, 1997), mais toutes ne sont pas nécessairement présentes chez un même organisme. Cela crée une interdépendance entre espèces dénitrifiantes, qui fait de cette réaction une voie métabolique dépendante de la présence d'une large communauté dénitrifiante.

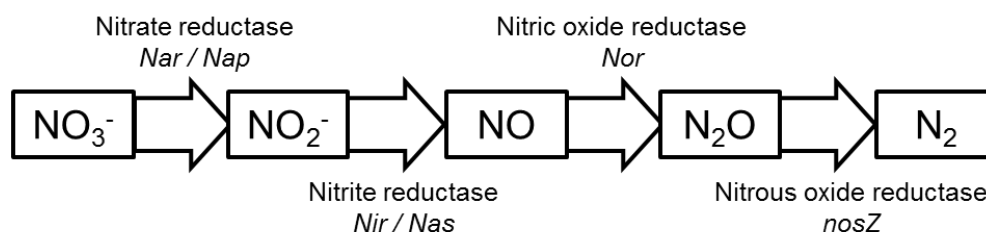


Figure 7- Dénitrification, enzymes et intermédiaires métaboliques

Il est important de noter que les Eucaryotes dénitrifiants (e.g. champignons) ont des enzymes proches de celles des Procaryotes (Zumft and Korner, 1997, Zumft, 1997). Certains

travaux indiquent que la dénitrification aérobie est possible pour une saturation en oxygène jusqu'à 90 % (Robertson et Kuenen, 1984), bien que la plupart du temps l'oxygène inhibe l'expression des gènes de dénitrification (Zumft, 1997, Gerardi, 2006). La plupart des Bactéries dénitrifiantes appartiennent à trois genres (*Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) mais plus de 100 séquences de *narG* et 85 séquences de *nosZ* étaient identifiées par Palmer et al. (2009). Le temps de génération est très variable, du fait de l'hétérogénéité des dénitrifiantes, mais un temps de génération de 15 à 30 minutes est possible pour les souches à prolifération rapide (Gerardi, 2006).

#### I.2.4. Anammox

Certaines Bactéries sont connues pour oxyder l'ammonium en conditions anaérobies (anammox), en utilisant le nitrite ou le nitrate comme accepteur final d'électrons en produisant du N<sub>2</sub> (Mulder et al., 1995) (Figure 8). Ce sont des chimiolithotrophes inhibées par 0,2 µM d'O<sub>2</sub> (Strous et al., 1997). Leur existence a longtemps été supposée, et ces organismes étaient déjà appelés les « lithotrophes manquant dans la nature » (Broda, 1977) avant que les planctomycètes soient reconnus jouant ce rôle (Strous et al., 1999). Les niches écologiques des Bactéries anammox sont pauvres en nutriments, étant donné que les fortes concentrations en substrat ont tendance à inhiber les anammox (Strous et al., 1997). Les Bactéries anammox n'ont pas pu être isolées en culture pures, mais les enrichissements obtenus ont montré une organisation intracellulaire complexe, avec un organite intracellulaire l'anammoxosome, où l'enzyme clé hydroxylamine/hydrazine oxydoréductase (Hao/Hzo) est localisée (Fuerst, 2005). La difficulté pour isoler des Bactéries anammox vient en partie du long temps de génération, entre 11 et 20 jours (Jetten et al., 2009) et cela cause des difficultés à identifier ces organismes par les techniques de microbiologie classique. Une particularité des planctomycètes est la composition de leur paroi : contrairement à la majorité des bactéries répondant négativement à la coloration de Gram, leur paroi est majoritairement constituée de protéines et non de peptidoglycane et les membranes de l'anammoxosome sont riches en laddéranes (Jetten et al., 2009, van Niftrik et al., 2004).

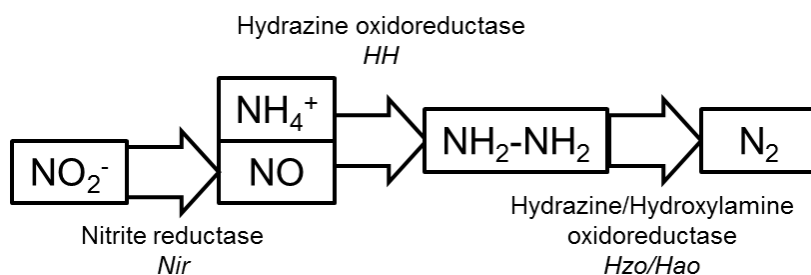


Figure 8- Anammox, enzymes et intermédiaires métaboliques

### I.2.5. Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA)

Contrairement à la dénitrification et à l'anammox qui permettent une sortie de l'azote de l'environnement, la DNRA mène à une rétention de l'azote biologiquement disponible, en conditions anoxiques. Le nitrate est réduit en ammonium (Figure 9), en suivant deux voies principales : la première est similaire à la fermentation, et l'autre est liée à l'oxydation du soufre (Burgin and Hamilton, 2007). Certains travaux suggèrent qu'en présence de faibles concentrations en nitrate et fortes concentrations de carbone, la DNRA est favorisée face à la dénitrification (Kelso et al., 1997). Le second type de DNRA est dépendant des concentrations en sulfures : la dénitrification se produirait en présence de faibles concentrations en sulfures, et la DNRA dans le cas contraire de fortes teneurs en sulfures (Brunet and GarciaGil, 1996). Dans certains environnements, la DNRA prend le pas sur la dénitrification en conditions anoxiques, consommant jusqu'à 80 % du nitrate (Bonin, 1996). Il apparaît de plus que la présence de sulfures inhibe la dénitrification, en plus de favoriser la DNRA (An et Gardner, 2002).

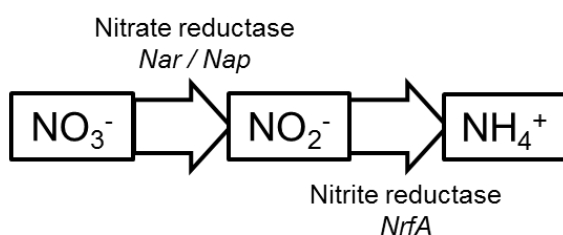


Figure 9 - DNRA, enzymes et intermédiaires métaboliques



### I.2.6. Le nitrite

Il est généralement attendu que les concentrations de nitrite soient faibles dans l'environnement, car c'est une molécule très réactive biochimiquement (Khan et al., 2010). Il est de plus considéré que les étapes d'élimination du nitrite sont plus rapides que celles qui les produisent. Ainsi en milieu oxygéné, l'oxydation de l'ammonium en nitrite est considérée comme l'étape limitante, par rapport à l'oxydation du nitrite considérée plus rapide (Kowalchuk et Stephen, 2001). Le nitrite fait l'objet d'une standardisation qui utilise le système en 5 classes (I à V) utilisé par l'International Commission for the Protection of the Danube River (ICPRD) qui remplace les normes françaises de 1978 (EU: 78/659/EC) de 0,2 et 0,6  $\mu\text{M NO}_2^-$  pour les salmonidés et les cyprinidés respectivement. Les normes actuelles définissent la classe I pour les concentrations inférieures à 0,7  $\mu\text{M NO}_2^-$  (<0,01 mg/L) comme valeurs naturelles, et la classe V pour les concentrations supérieures à 21  $\mu\text{M NO}_2^-$  (>0,3 mg/L). La valeur cible est la classe II pour une concentration environnementale de 4  $\mu\text{M NO}_2^-$  (0,06 mg/L). Avant l'introduction des normes des concentrations de nitrite supérieures à la norme environnementale de 0,7  $\mu\text{M}$  sont souvent observées dans les rivières et les sédiments (Morris et al., 1985, Kelso et al., 1997, Von der Wiese and Wetzel, 1998). Des expériences en laboratoire ont permis de montrer que plusieurs paramètres peuvent influencer l'accumulation de nitrite dans l'environnement. Il a ainsi été montré que le pH entre 8 et 9, les faibles concentrations en  $\text{O}_2$ , les températures au-delà de 30°C et les fortes concentrations en ammonium provoquent une accumulation de nitrite en laboratoire (Anthonisen et al., 1976, Bae et al., 2001, Ruiz et al., 2003, Gieseke et al., 2003, Wang et Yang, 2004, Kim et al., 2006). Ces travaux montrent une accumulation de nitrite pour un pH entre 8 et 9 ainsi que pour des concentrations en oxygène entre 0,5 et 1,7  $\text{mg.L}^{-1}$ . Il a également été montré une diminution de 50 % de l'efficacité d'élimination du nitrite pour des concentrations en ammonium de 0,7  $\text{mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ .

Dans la Seine en aval de Paris, le nitrite a été mesuré à des concentrations supérieures aux limites de l'ECD (Garnier et al., 2007) entre 1,4 et 28,6  $\mu\text{M NO}_2^-$  de Paris à l'estuaire pour la période 1998-2003. Jusqu'en 2007, de fortes quantités d'ammonium (70 - 430  $\mu\text{M NH}_4^+$ ) étaient rejetées par les stations d'épuration de l'agglomération parisienne, qui étaient oxydées en nitrite le long de la basse Seine. L'amélioration des traitements en 2007 par l'ajout de traitement de nitrification ainsi qu'une dénitrification partielle des eaux nitrifiées a permis de diminuer l'impact de ces STEPs. Ces traitements ont conduit à la diminution des rejets en ammonium (57 tonnes de  $\text{N-NH}_4^+ \text{ j}^{-1}$  avant 2007 puis 13 après 2007)

alors que les rejets de nitrite ont augmenté ( $0,75 \text{ tonnes de } \text{N-NO}_2^- \text{ j}^{-1}$  avant 2007 puis 2,2 après 2007) (Aissa-Grouz et al., 2015). Les concentrations de nitrites mesurées dans la Seine en aval étaient supérieures aux normes de l'ECD plusieurs dizaines de km en aval de Paris, et cette persistance du nitrite dans la Seine était variable au cours de l'année.

### I.3. Objectifs

Ce travail a dû répondre à la question centrale de l'origine et du devenir du nitrite déclassant pour la qualité de l'eau en aval des stations d'épuration de l'agglomération parisienne.

L'hypothèse a été que la dynamique du nitrite en Seine aux abords de Paris était contrôlée par les Procaryotes allochtones rejetés avec les effluents des stations d'épuration et ceux autochtones en provenance de l'amont du bassin versant (Figure 10). Il s'agissait au total de quantifier l'impact des effluents de l'agglomération parisienne dans un nouveau contexte de traitement de l'azote, en nitrification depuis 2007 et en dénitrification depuis 2011.

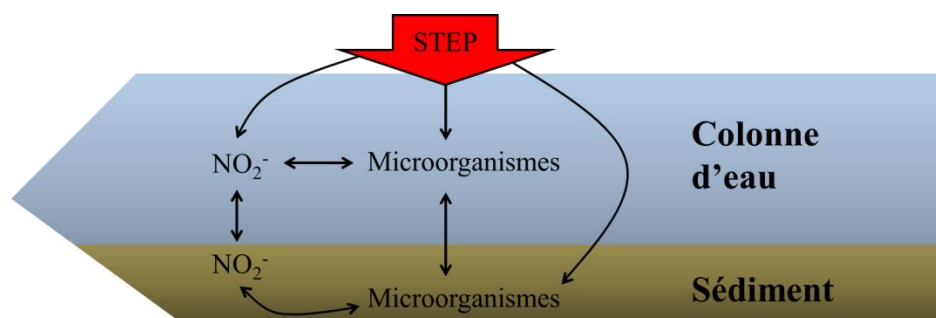


Figure 10 - Hypothèses de l'influence des rejets de STEP sur les Procaryotes de la Seine ainsi que sur la dynamique du nitrite entre la colonne d'eau, le sédiment et les eaux usées

Les Procaryotes ont donc été étudiés sous plusieurs aspects, leur diversité en termes d'unité taxonomique opérationnelle (UTO) et d'indice de similarité et leur abondance de gènes, mais également leur activité. Les variations des concentrations des formes de l'azote associées ont été analysées en parallèle.

Les techniques principales utilisées lors de cette thèse ont été la biologie moléculaire et les analyses biogéochimiques. Les analyses biogéochimiques ont été importantes pour connaître les concentrations des molécules d'intérêt dans le milieu, ainsi que leur répartition et leurs flux. La cinétique des réactions biogéochimiques en conditions expérimentales a permis de connaître l'activité des Procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote. La biologie

moléculaire était un outil de choix pour analyser les Procaryotes dans l'environnement, dans la mesure où la culture des Bactéries et Archées nitrifiantes, fonctionnelles de l'environnement est difficile (parfois impossible dans l'état actuel des connaissances). A cette difficulté de cultiver les Procaryotes environnementaux, s'ajoute le temps de génération de certains de ces organismes, qui dépasse une semaine pour certains, ce qui aurait conduit à des expériences trop longues dans le cadre d'un travail de thèse, limité dans le temps.

La première étape des recherches a été de quantifier les différents groupes responsables de la dynamique du nitrite dans la Seine (les ammonium-oxydants et les nitrite-oxydants), leur importance relative par rapport à la communauté des nitrifiants, mais aussi par rapport à l'ensemble des Procaryotes. Ce recensement a eu lieu dans la colonne d'eau (nitrification) ainsi que le sédiment (nitrification, dénitrification, anammox, DNRA). Les rejets des stations d'épuration ont également été examinés. Parmi les outils de la biologie moléculaire, la qPCR a été le principal outil utilisé, et a permis de mesurer l'abondance d'un nombre de copies de gènes marqueurs des communautés microbiennes. Une seconde approche a été de déterminer l'impact des populations étudiées sur la concentration en nitrite, en déterminant les taux de production ou d'élimination du nitrite de ces environnements, replacés en conditions expérimentales contrôlées.

Après un premier chapitre d'introduction et matériel et méthode, le chapitre 2 aborde l'implication du sédiment dans la dynamique du nitrite dans la Seine et son rôle en tant que source ou puits de nitrite.

Le troisième chapitre examine le rôle de la colonne d'eau dans la dynamique du nitrite dans la Seine et la quantification des gènes Procaryotes associés aux différentes étapes de la nitrification. Généralement, les mêmes approches sont utilisées que dans le sédiment avec l'utilisation de la DGGE en appoint pour définir les nombres d'unité taxonomique opérationnelle et les indices de similarité.

Nous avons cherché avec ces différentes approches à déterminer les rôles de la colonne d'eau et du sédiment dans la persistance du nitrite ainsi que l'impact des pressions anthropiques sur la dynamique du nitrite. Au chapitre 4, la discussion générale met enfin en perspectives l'ensemble des résultats obtenus dans le sédiment et dans la colonne d'eau.

## II. Matériel et Méthodes

### II.1. Site d'étude et prélèvement

La Seine est un fleuve situé dans la partie nord-ouest de la France, et son bassin versant est le plus peuplé de France (17,5 millions en 2006). La plus forte concentration de population est centrée sur Paris (environ 12,5 millions d'habitants pour l'agglomération), zone sur laquelle est focalisée cette étude (Figure 11). Deux stations d'épuration (STEPs) sont étudiées : l'une en amont à Seine Amont (SAM), l'autre en aval à Seine Aval (SAV) de Paris, respectivement à Valenton et Achères, toutes deux dans l'agglomération parisienne. Ces deux STEPs sont gérées par le 'Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne' (SIAAP). La STEP SAM reçoit 0,6 millions de m<sup>3</sup> d'eau usée par jour, et un traitement de nitrification permet d'éliminer l'ammonium en le transformant en nitrate. La STEP SAV reçoit 1,7 millions de m<sup>3</sup> par jour, et les eaux usées sont traitées par nitrification comme à SAM, mais est suivie par un traitement de dénitrification (mise en place progressive avec un objectif de 100 %), ayant pour but d'éliminer le nitrate sous forme de N<sub>2</sub> (Rocher et al., 2012a, Rocher et al., 2012b). La station d'épuration Seine Centre (SEC) est située entre le point de prélèvement Asnières et le point de rejet de SAV. Cette position en fait un élément pouvant influencer les observations faites entre Asnières (Asn) et Conflans S<sup>te</sup> Honorine (Cos), car nous ne disposons pas de point de prélèvement dans les eaux de rejet de cette STEP. Cependant les traitements de l'azote sont similaires à SEC et SAV (nitrification et dénitrification), et la capacité de traitement de SEC correspond à 14% de la capacité de traitement de SAV. On a donc attribué majoritairement l'impact des STEP observés à l'aval d'Asnières aux rejets de SAV.

Des eaux de rivière ainsi que les rejets de STEPs (Figure 11) sont recueillis par la 'Direction Développement et Prospective' (DDP) du SIAAP. Les échantillons de rivière sont collectés depuis des ponts traversant la Seine et la Marne. Les eaux de rejet SAV et SAM sont un mélange des eaux rejetées pendant 24 h par la STEP. Les échantillons environnementaux de la Seine et les rejets de STEPs sont conditionnés dans des bidons en plastique de 2 L avant d'être acheminés au laboratoire dans une glacière. Les différents sites de prélèvement sont situés sur une section de 160 km de long. Les sites de prélèvement d'eau sont : Choisy le Roi (Cho), les rejets de Seine Amont (SAM), Charenton (Cha) sur la Marne, Asnières (Asn) sur la Seine, les rejets de Seine Aval (SAV), Conflans S<sup>te</sup> Honorine (Cos), Poissy (Poi), Méricourt (Mer), tous trois sur la Seine en aval de SAV (Figure 11). Les prélèvements en Seine et en

STEPs ont fait l'objet de deux stratégies d'échantillonnage : 1) des échantillons ont été prélevés à toutes les huit stations mentionnées à deux périodes contrastées en août et décembre 2012; 2) les prélèvements en STEPs et à deux des stations en Seine ont été effectués mensuellement de mars 2012 à février 2013.

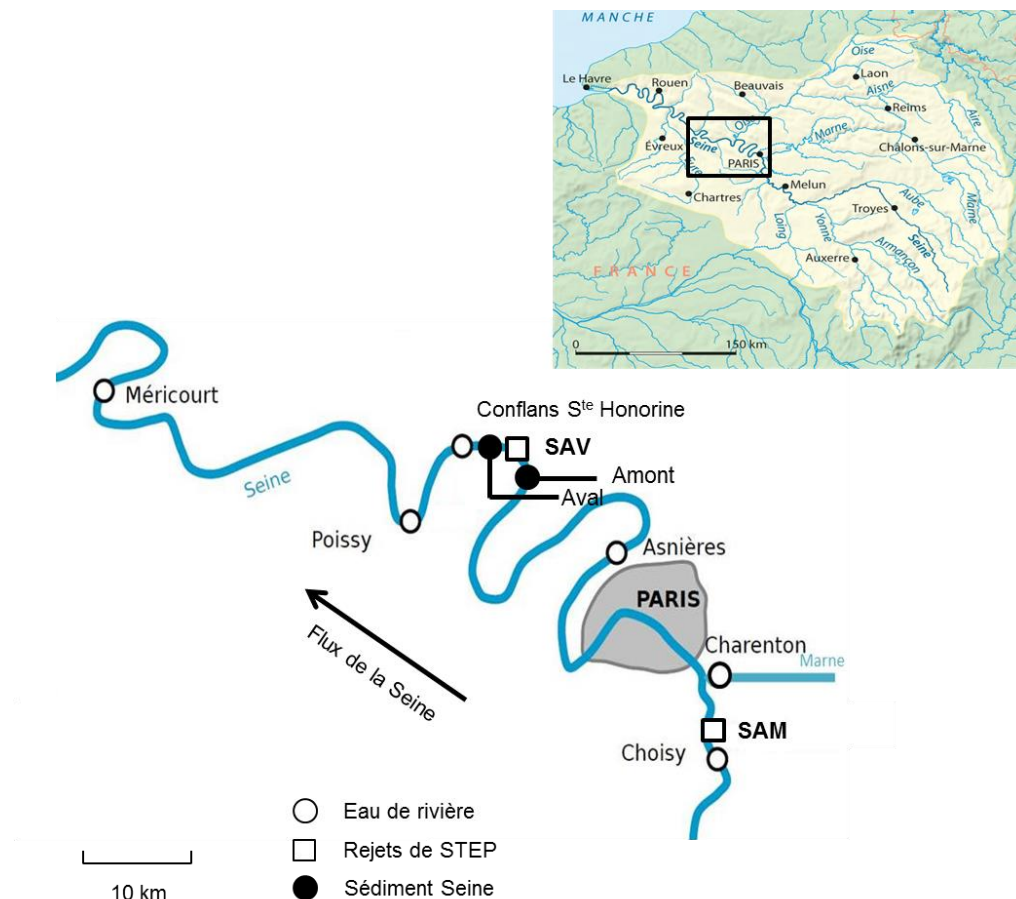


Figure 11 - Carte des points de prélèvement d'eau et de sédiment dans l'agglomération parisienne

Pour les expériences d'activité nitrifiante, un volume de 10 à 20 L est prélevé sur différents sites à plusieurs dates : Asnières et Poissy en avril 2012, Asnières, Poissy et les effluents de SAV en novembre 2012, et Choisy, Asnières, Poissy, Méricourt ainsi que les effluents de SAV en mai 2013. Ces échantillons sont conservés à 4°C à l'obscurité jusqu'à leur conditionnement et/ou expériences de cinétique.

Les sédiments sont prélevés depuis un bateau avec le concours du SIAAP, 300 m en amont et en aval de SAV, dans des zones de dépôt de sédiment (Figure 11). Un carottier à gravité a été utilisé, avec des tubes en plexiglas de 0,6 m de long pour 9 cm de diamètre extérieur (8,5 cm de diamètre intérieur). Six carottes sont prélevées sur chacun de deux sites,

deux utilisées sur place pour prélever immédiatement l'eau interstitielle tous les cm entre l'eau surnageant et 10 cm de profondeur au moyen de MicroRhizons (Rhisosphere research, Pays Bas). Les quatre autres carottes sont transportées au laboratoire pour les analyses de flux de nitrite, les profils d'O<sub>2</sub>, les extractions d'ADN ainsi que d'azote et carbone total. Les rhizons se composent d'une tige poreuse en fibre de verre au bout de laquelle des seringues stériles ont été adaptées. Les tubes en plexiglas utilisés pour prélever l'eau interstitielle présentent des trous de 2,5 mm de diamètre tous les cm, bouchés avec du ruban adhésif pendant le prélèvement des carottes. Ce ruban adhésif est percé juste avant le prélèvement de l'eau interstitielle pour laisser passer les rhizons. Pour mesurer les conditions dans la colonne d'eau, des prélèvements d'eau de surface ont été effectués en même temps que le sédiment. Deux bouteilles en plastique de 2 L sont remplies à chaque site après rinçage des récipients avec l'eau du site, puis conservées à l'obscurité jusqu'au laboratoire. Une sonde multiparamètre YSI 6920 (YSI, USA) est utilisée pour mesurer le pH, la température, la conductivité ainsi que la concentration en oxygène dissous de la colonne d'eau. Les prélèvements ont eu lieu à Sartrouville en amont et à la Frette en aval, à environ 300 m des rejets de la STEP.

## **II.2. Prétraitement des échantillons**

Afin de connaître la charge des eaux en matière en suspension (MES) les échantillons d'eau sont homogénéisés puis filtrés sur un filtre en fibre de verre Whatman GF/C (GE healthcare, USA) de porosité 1,2 µm (Figure 12). Pour obtenir l'ADN présent dans les échantillons, l'eau est homogénéisée puis filtrée en triplicats sur des filtres de porosité 0,22 µm en PolyVinylidene Fluoride (PVDF, Millipore, USA), à raison de 3 fois 200 mL pour les échantillons environnementaux, et 3 fois 60 mL pour les rejets de STEP (Figure 12). Les filtres supportant les cellules procaryotes sont ensuite pliés et conditionnés dans des tubes de 2 mL et conservés à -80°C avant extraction.

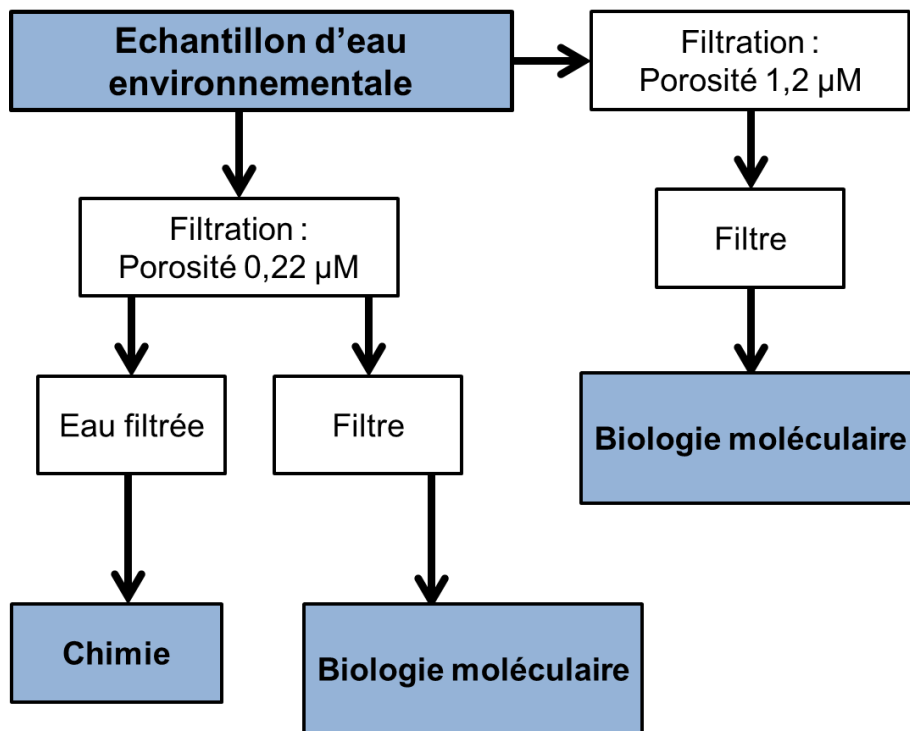


Figure 12 - Prétraitement des échantillons prélevés dans la colonne d'eau

Les quatre carottes utilisées en laboratoire ont eu deux usages : une est utilisée pour déterminer les profils en oxygène, et les trois autres pour mesurer les flux d'azote entre le sédiment et l'eau surnageante (flux benthique). Les trois carottes 'flux' sont utilisées telles quelles, mais la carotte utilisée pour le profil d'oxygène doit être reconditionnée dans une carotte plus petite afin de s'adapter à la sonde O<sub>2</sub> (Unisense, Danemark). Après les expériences, deux carottes utilisées pour les flux ainsi que la carotte utilisée pour le profil d'oxygène sont découpées tous les cm jusqu'à 8 cm de profondeur. Les 5 mm du bord extérieur des carottes sont jetés afin d'éliminer l'effet des transferts verticaux de sédiment le long de la paroi lors des prélèvements. Chaque cm prélevé est homogénéisé carotte par carotte en mélangeant le sédiment prélevé au moyen d'une spatule dans un bécher (nettoyé à l'eau puis à l'alcool entre chaque échantillon). Environ 5 cm<sup>3</sup> de chacun des échantillons produit a été utilisé pour connaître la porosité du sédiment et 5 autres cm<sup>3</sup> ont été conservés dans des sachets hermétique à -80°C avant extraction d'ADN. Le reste du sédiment est conservé au congélateur à -20°C puis lyophilisé, avant d'être broyé pour mesurer l'azote et le carbone total (analyses non réalisées à ce jour).

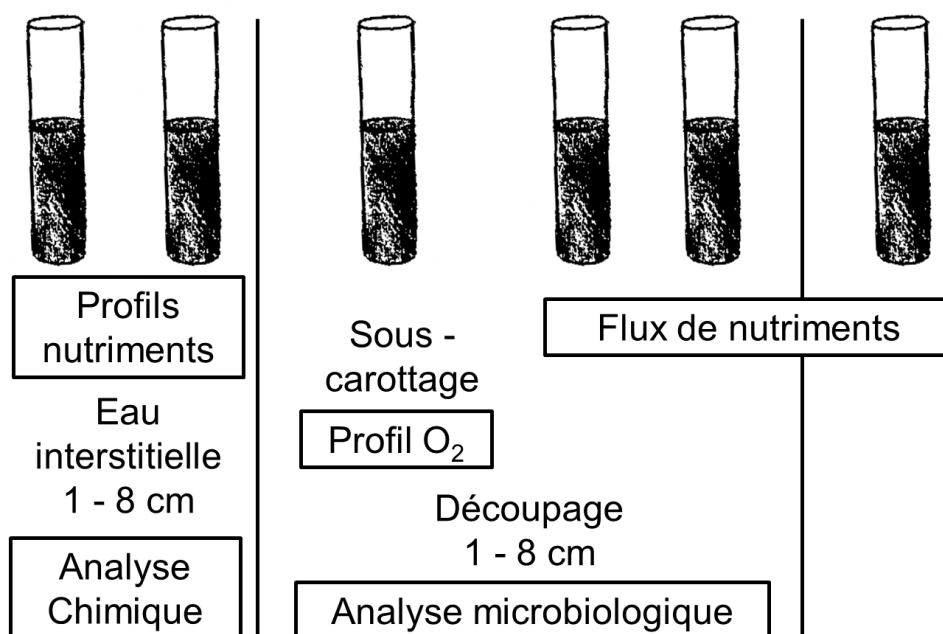


Figure 13 - Prétraitement des carottes de sédiments

### II.3. Analyses physique et chimique

Les eaux éluées sur filtre PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  de porosité (Millipore) sont utilisées pour déterminer les concentrations de nitrite. La méthode utilisée pour le dosage du nitrite est colorimétrique, avec les réactifs suivants : sulfanilamide 1 % m/v et *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) 0,05 % m/v. 300  $\mu\text{L}$  d'échantillons sont colorés avec 30  $\mu\text{L}$  de réactif. Après 20 minutes de coloration dans le noir, l'absorbance à 540 nm est mesurée avec un spectrophotomètre SpectroSTAR nano (BMG labtech, Allemagne). Le dosage est effectué grâce à une gamme étalon de 1 à 30  $\mu\text{M}$ , avec de ce fait une limite inférieure de détection de 1  $\mu\text{M}$ .

Afin de mesurer la charge des eaux en matière en suspension (MES) les échantillons issus de la colonne d'eau sont homogénéisés puis filtrés sur filtres en fibre de verre Whatman GF/C (GE healthcare, USA) de verre de porosité 0,7  $\mu\text{m}$  pré-pesés avant d'être séchés 24 heures à 110°C. Les filtres sont ensuite repesés afin de déterminer le poids sec de MES dans l'eau à chacun des points échantillonnés.

Les autres paramètres (ammonium, nitrate et pH) sont dosés dans le laboratoire COFRAC (Comité Français d'accréditation) du SIAAP pour les stations de Choisy, SAM, Bougival (20 km en aval d'Asnières, avant SAV mais après Seine Centre), SAV et Poissy.



Les débits sont également fournis par le SIAAP pour ces stations. Les résultats obtenus pour Bougival ont été assimilés à ceux qui auraient été obtenus à Asnières dans la mesure où la station Seine Centre traite un volume d'eau faible comparé à Seine Aval.

Pour les eaux interstitielles du sédiment, le nitrite est dosé de la même façon que les échantillons de la colonne d'eau. Les dosages d'ammonium et nitrate sont dosés en cuvette par photométrie et électrochimie sur un appareil Gallery (Thermo Scientific, France) pour lequel la limite de détection est de l'ordre du ppb. Le sulfate est dosé par HPLC en phase liquide sur un appareil DIONEX (Thermo Scientific, France) Les concentrations de nitrite, nitrate, ammonium et sulfate de l'eau surnageante sont déterminées de la même manière que l'eau interstitielle. La méthode utilisée pour le dosage du nitrite est colorimétrique suivant le protocole décrit en début de partie II.3.

#### **II.4.        Calculs de similarité de communautés par DGGE**

L'étape qui précède les analyses en biologie moléculaire est l'extraction de l'ADN. Pour extraire l'ADN des Procaryotes retenus sur les filtres ou dans le sédiment, on utilise le kit Powersoil ADN isolation Kit (MOBIO, USA) en suivant le protocole du fournisseur modifié comme suit. La lyse physique des cellules présentes sur les filtres ou dans le sédiment est effectuée par agitation des tubes PowerBead contenant des billes de silice dans un appareil FastPrep FP120 (BIO 101) 45 secondes 2 fois à 4,5 Hz. Les filtres sont coupés en 4 pour faciliter la lyse, et 0,25 mg de sédiment est pesé pour l'extraction. Ici apparait donc le premier biais de la biologie moléculaire. En effet, l'extraction/purification de l'ADN d'un échantillon conduit à la perte d'une partie du matériel (de Lipthay et al., 2004). Cette perte se fera surtout sentir dans les séquences « rares », qui ont statistiquement plus de chance d'être perdues du fait du faible nombre de copies de l'ADN des espèces peu représentées dans l'échantillon.

La première étape de la DGGE repose donc sur l'amplification ciblée d'un gène d'intérêt, grâce à l'enzyme MyTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase (BioLine, Royaume Uni) et le tampon associé. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur G-Storm GS2 (G-Storm, Royaume Uni). Pour l'analyse des bactéries oxydant l'ammonium (AOB) la PCR utilisée est une PCR « nested », qui repose sur deux PCR successives sur le gène de l'ARNr 16S. Le premier jeu d'amorces (CTO) (Kowalchuk et al., 1997, Kowalchuk et al., 1998) cible le 16S des AOB spécifiquement, et le second est généraliste des Bactéries (Muyzer et al., 1993) (Tableau 1). Les séquences cibles du second jeu d'amorces sont incluses dans le fragment amplifié par la première PCR, et le fragment amplifié est mieux adapté à la DGGE. Pour

l'analyse de diversité des Archées oxydant l'ammonium (AOA), un seul jeu d'amorces est utilisé ciblant le gène *amoA* (Konneke et al., 2005, Tourna et al., 2008) (Tableau 1). Ici arrive un biais dans l'analyse de diversité dans la mesure où l'amplification par PCR est une réaction exponentielle, les différences d'abondance se retrouvent amplifiées entre les séquences majoritaires et les séquences rares.

La DGGE « Denaturing Gradient Gel Electrophoresis » ou électrophorèse sur gel à gradient de dénaturant consiste en une amplification du gène d'intérêt dans l'échantillon à analyser. Le gène est amplifié pour tous les Procaryotes qui le possèdent, représentant différentes séquences ou unités taxonomique opérationnelles (UTO). Une UTO peut représenter une souche, une espèce ou un groupe d'espèce, suivant la variabilité du fragment d'ADN. En considérant les séquences d'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), les UTO rassemblent les individus dont la séquence a au maximum 3% de différence (97% de similitude) (Schloss and Handelsman, 2005). Ces UTOs possèdent un pourcentage en base G et C qui varie suivant la séquence du gène et ce pourcentage de G/C modifie la facilité avec laquelle l'ADN est dénaturé (séparation des deux brins de l'ADN), que ce soit thermiquement ou chimiquement. Un biais de la DGGE sera donc la co-migration d'UTO dont la séquence est proche, mais également des UTO dont les séquences sont très différentes mais dont le pourcentage en GC est proche. Pour éviter la séparation complète des deux brins de l'ADN, une des amorces utilisées possède une pince GC (GC-clamp) qui consiste en un fragment de plusieurs dizaines de base G ou C se suivant à une extrémité de la séquence à amplifier. Lors de l'amplification, cette section d'ADN va se trouver également amplifiée, ce qui va créer une section de l'ADN extrêmement résistante à la dénaturation.

Les dénaturants utilisés sont le formamide et l'urée selon un gradient de 40 à 70 % pour l'analyse des AOB, et selon un gradient de 15 à 55 % pour l'analyse des AOA. La migration est effectuée dans un bain de TAE 1X chauffé à 62°C sous une tension constante de 130 V pour une intensité optimale de 70 mA pendant 17h40. Un marqueur de taille 100 pb (Invitrogen, USA) est utilisé comme marqueur de migration en vue de la normalisation des gels. Ainsi, au moins 4 puits du gel sont occupés par ce marqueur (1 µg/µL) à raison de 25 µL de chaque côté des échantillons, et 2 fois 20 µL au milieu des échantillons. Le gel est ensuite coloré par un agent intercalant, 25 µL de SightDNA Stain (euromedex, Allemagne) dans 300 mL de TAE 1X pendant 15 minutes à l'obscurité, avant une étape de décoloration de 20 minutes dans 300 mL de TAE 1X. La photo du gel est obtenue grâce à un imageur GelDoc XR (Biorad, USA), et est analysée grâce au logiciel Gel Compar 6.2 (Applied Math,

Belgique) qui calcule le pourcentage de similarité selon l'indice de Jaccard entre les différents échantillons en fonction du profil de bandes pour chaque échantillon. La première étape d'analyse du gel est la transformation de l'image acquise en niveau de gris par le logiciel Gel Compar 6.2. Les différents profils de migrations sont ensuite délimités et leur trajectoires ajustées. Ensuite, les bandes du marqueur de migration sont notées, et le logiciel normalise la distance de migration en chaque point du gel en fonction de la distance de migrations des bandes du marqueur. La dernière étape où l'utilisateur intervient est l'identification des bandes sur chaque profil de migration. Chaque bande présente sur le gel de DGGE représente une UTO. Il faut également prendre en compte le fait que cette technique utilise l'ADN présent dans les échantillons. Ceci implique que ce qui est amplifié ne correspond pas forcément à des organismes vivants, ni ne tient compte de leur activité. Le dernier biais de la DGGE est enfin l'acquisition de l'image et l'analyse informatique. La limite de détection pour une bande unique est la même que pour la PCR classique (1 à 5 ng pour une bande), mais il faut prendre en compte les différences d'intensité. Les bandes pour les UTO rares ne seront donc pas visibles car la différence d'intensité, entre les bandes majoritaires et les bandes minoritaires, sera trop importante pour une capture d'image de bonne qualité. Cependant le biais est le même pour tous les échantillons comparés, et la technique de lyse « beadbeating » a été montrée comme permettant d'obtenir la plus grande diversité (de Liphay et al., 2004). La technique DGGE permet donc de répondre de façon satisfaisante aux questions posées lors de cette thèse en donnant une indication sur la similarité entre échantillons, même si sa précision est plus faible que pour d'autres techniques (*e.g.* métagénomique).

L'indice de Jaccard est calculé comme suit pour deux profils de migrations A et B :

$$J(A, B) = \frac{(A \cap B)}{(A \cup B)}$$

$A \cap B$  = UTO en commun dans les profils de migration A et B

$A \cup B$  = ensemble des UTO dans les 2 profils de migration A et B

Tableau 1 - Liste des amorces utilisées en PCR et qPCR

Gène cible	Primer	Taille amplifiée	Conditions de PCR/qPCR	Matériau*	standard PCR/qPCR standard	Reference
16S Bactérien	F-357 GC R-518	0,05 µM 0,05 µM	30° 95° ; 30° 55° ; 1' 72° (x40)		Clone issu de <i>Nitrobacter hamburgensis</i>	Muyzer et al., 1993 Muyzer et al., 1993
16S bactérien*	63F BUI68.4	0,4 µM 0,4 µM	15° 95° ; 30° 64° ; 30° 72° (x40)	SeraFast YBR no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW.25	Marchesi et al., 1998 Muyzer et al., 1993
16S Amibien	109F 1492R	0,2 µM 0,2 µM	15° 95° ; 30° 64° ; 30° 72° (x40)		Clone issu de <i>Nitrosopharmax viennensis</i>	Groskopf et al., 1998 Lase et al., 1991
16S Amibien	771F 927R	0,2 µM 0,2 µM	30° 92° ; 30° 55° ; 2' 72° C (35x)		Clone issu de <i>Nitrosopharmax viennensis</i>	Ochseneier et al., 2003 Ochseneier et al., 2004
16S Amibien*	Amib806F Amib915R	0,6 µM 0,6 µM	30° 92° ; 30° 55° ; 1' 72° C (35x)	SeraFast YBR no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	Clone issu de <i>Nitrosopharmax viennensis</i>	Takai et al., 2000
16S AOB	198F A+B 198F C 654R	0,33 µM 0,17 µM 0,5 µM	30° 92° ; 30° 57° ; 45° 72° (x38)		Clone issu de l'environnement	Strahl & Altmann, 1991 Kowalkuk et al., 1997 Kowalkuk et al., 1998 Kowalkuk et al., 1998
AOB <i>amoA</i> *	amoA 1F AmoA 2R	0,8 µM 0,8 µM	10° 95° ; 30° 60° ; 30° 72° (x40)	LightCycler 480 SYBR Green MasterMix (Roche, USA)	Clone issu de l'environnement	Rothmann et al., 1997 Rothmann et al., 1997
AOA <i>amoA</i>	A23F A616R	0,3 µM 0,3 µM	10° 95° ; 30° 60° ; 30° 72° (x40)	LightCycler 480 SYBR Green MasterMix (Roche, USA)	Clone issu de l'environnement	Komake et al., 2005 Touma et al., 2008
<i>Nitrobacter mixA</i> *	F1 mixA R2 mixA	0,4 µM 0,4 µM	30° 95° ; 45° 55° ; 45° 72° (x35)	SeraFast YBR no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	Clone issu de <i>Nitrobacter hamburgensis</i>	Wertz et al., 2008 Wertz et al., 2008
16S <i>Nitrospina</i> *	NH8SU_130F NH8SU_282R	0,6 µM 0,6 µM	10° 95° ; 30° 57° ; 30° 72° (x40)	SeraFast YBR no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	Clone issu de <i>Nitrospina gracilis</i> 3211	Mincer et al., 2007 Mincer et al., 2007
16S <i>Nitrospina</i> *	NSR1113f NSR1264r	0,6 µM 0,6 µM	20° 95° ; 60° 68° (x5)	SeraFast Probe no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	Clone issu de <i>Nitrospira defluvi</i> A17	Dentist et al., 2003 Dentist et al., 2003 Dentist et al., 2003
16S <i>Nitrobacter</i> *	NSR1143fThq Nmo-1198f Nmo-1425r Nmo-1374Thq	0,6 µM 0,6 µM 0,6 µM 0,25 µM	20° 95° ; 60° 58° (x50)	SeraFast Probe no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	Clone issu de <i>Nitrobacter hamburgensis</i>	Graham et al., 2007 Graham et al., 2007 Graham et al., 2007
DNA <i>myA</i> *	myAF 2aw myBR1	0,8 µM 0,8 µM	10° 95° ; 30° 53° ; 30° 72° (x40)	SeraFast YBR no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	Clone issu de l'environnement	Walsh et al., 2013 Mohan et al., 2004
Déterminant <i>nozZ</i> *	nozZF nozZ162Eb	0,2 µM 0,2 µM	10° 95° ; 30° 61° 56 ; 30° 72° (x36) 10° 95° ; 30° 56 ; 30° 72° (30)	SeraFast YBR no-Rox MasterMix (BioLabs, UK)	Clone issu de l'environnement	Kloos et al., 2001 Kloos et al., 2001

\* Amorces utilisées en qPCR

≡ Position de la pince GC

## II.5. Quantification de gènes d'intérêt par qPCR

L'abondance des Procaryotes est estimée grâce à la technique de PCR quantitative (qPCR). Cette technique repose sur le suivi en temps réel de l'amplification dans le milieu réactionnel. L'amplification dans l'échantillon à quantifier est comparée à l'amplification d'une gamme étalon, préparée avec un ADN contenant la séquence cible en nombre connu. Deux types de méthodologies sont utilisés: avec sonde TaqMan ou avec SYBR Green. Une sonde TaqMan est un court fragment d'ADN simple brin de type amorce, qui est dessiné pour s'hybrider à la séquence cible. Sur ce fragment, est fixée une sonde fluorescente (6-carboxyfluorescein, *FAM*) couplée à son inhibiteur de fluorescence (tetramethylrhodamine, *TAMRA*). L'enzyme polymérase décroche la sonde et son inhibiteur au moment de la polymérisation du brin d'ADN, ce qui induit une fluorescence proportionnelle au nombre de séquences amplifiées. Dans le cas de l'autre méthodologie, la fluorescence est assurée par la présence d'un agent intercalant, le SYBRGreen présent directement dans le milieu réactionnel qui se fixe à l'ADN double brin de façon non spécifique (intensité de fluorescence dépendante de la longueur du fragment amplifié, et fluorescence de l'ADN génomique présent dans l'échantillon) L'étalonnage des qPCR est effectué grâce à des clones des gènes d'intérêt pour tous les gènes utilisés à l'exception du gène de l'ADNr 16S pour lequel on utilise l'ADN génomique de *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (qui contient 5 copies du gène *ADNr 16S*). Le clonage est effectué en insérant le gène d'intérêt dans un plasmide pGEM-T Easy Vector (Promega). L'étalonnage est effectué par dilution décimale pour obtenir une gamme entre  $10^2$  et  $10^8$  copies de gène par  $\mu\text{L}$ .

Les qPCR ont toutes été effectuées dans un milieu réactionnel de 10  $\mu\text{L}$  grâce à une solution de base appelée « Mastermix ». Cette solution contient l'enzyme, le tampon réactionnel, les nucléotides (dNTP), et optionnellement un agent intercalant, auxquels il suffit d'ajouter les amorces et l'échantillon. Trois Mastermix sont utilisés en fonction des amorces utilisées : le mastermix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Suisse) ou indifféremment Sensifast SYBR No-Rox (Bioline, Royaume Uni), et le mastermix SensiFast Probe No-Rox (Bioline, Royaume Uni). Les cycles d'amplification et l'acquisition des résultats de qPCR sont effectués grâce au LightCycler 480 (Roche, Suisse). Les résultats bruts sont analysés grâce au logiciel LightCycler 480 (Roche, Suisse) selon la méthode des dérivées secondes après vérification de la bonne amplification par melting curve (pour les qPCR sans sonde). Une efficacité de réaction entre 1,9 et 2 est attendue, consistant en un doublement de l'intensité lumineuse entre deux cycles d'amplification, pour une erreur en dessous de 0,2

(régression linéaire de la moyenne des erreurs au carré). Les différences entre les échantillons sont vérifiées grâce à un test statistique ANOVA ( $p < 0,05$ ) sur le logiciel SigmaPlot (v11.0).

L'abondance des communautés totales bactériennes et archéennes est déterminée au moyen d'amorce générale. Les communautés bactériennes totales sont analysées au moyen des amorces 63F (Marchesi et al., 1998) et BU16S4 (Muyzer et al., 1993) (Tableau 1), tandis que les communautés archéennes le sont au moyen des amorces Arch 806 (Takai et al., 2000) et Arch 916 (Stahl & Amann, 1991) (Tableau 1). L'abondance des communautés microbiennes d'intérêt est faite au moyen de la technique de qPCR, avec des amorces spécifiques du gène *amoA* pour les AOB (Rotthauwe et al., 1997), les AOA (Konneke et al., 2005, Tourna et al., 2008). Pour les NOB les bactéries du genre *Nitrobacter* (NBC) ont été ciblées au moyen de l'ADNr *16S* avec des amorces et sondes spécifiques ou du gène *nxrA* (Graham et al., 2007, Wertz et al., 2008) et les bactéries du genre *Nitrospira* (NSR) ont été ciblées au moyen de l'ADNr *16S* avec des amorces et sondes spécifiques (Dionisi et al., 2003) (Tableau 1).

Il convient d'avoir à l'esprit que lors de cette thèse les résultats ont été obtenus sur de l'ADN. Cela implique qu'ils ne tiennent pas compte uniquement des organismes vivants, mais également des reliquats d'ADN présents dans l'environnement après la mort des cellules. L'abondance du « gène d'intérêt ou marqueur d'une communauté » pourra cependant être mentionné comme étant l'abondance de la « communauté » visée par abus de langage.

## II.6. Spécificité et pertinence des amorces

Les amorces utilisées lors de cette thèse ciblent des communautés de Procaryotes différentes comprenant une diversité plus ou moins grande, et des gènes taxonomiques (ADNr *16S*) ou fonctionnels (e.g. *nxrA*, *amoA*). Le nombre de copie des opérons d'ADNr 16S influence la niche écologique de l'organisme (Klappenbach et al., 2000), et les organismes avec un grand nombre de copies de l'ADNr 16S sont plus adaptés à des environnements riches en nutriment. Le nombre d'opéron varie entre 1 et 15 pour les Bactéries, et entre 1 et 5 pour les Archées (Acinas et al., 2004). Il est courant d'observer 7 copies parmi les Bactéries, même si 40% possèderaient 1 ou 2 copies, alors que le nombre d'opéron le plus courant est 1 (Acinas et al., 2004). La comparaison de l'abondance du gène ADNr 16S pour les Bactéries et

les Archées est donc un peu artificielle, mais permet d'avoir une estimation du nombre d'organismes à un ordre de grandeur près.

Concernant les communautés fonctionnelles, l'utilisation d'un gène fonctionnel a été privilégiée dans la mesure du possible, ce qui a conduit à l'utilisation du gène 16S pour le genre nitrite oxydant *Nitrospira* uniquement. Les amorces choisies pour les oxydant de l'ammonium présentent toutes deux un biais différent : alors que le gène *amoA* peut être présent à plusieurs exemplaires chez les AOB (utilisation de PrimerBLAST, NCBI), le gène *amoA* n'est présent qu'à un seul exemplaire chez les AOA (PrimerBLAST, NCBI) mais peut être inactif chez certaines espèces (Mussmann et al., 2011). Cela conduit à une surestimation du nombre des Procaryotes oxydant l'ammonium par l'utilisation de la qPCR, pour les AOB comme pour les AOA. Pour la quantification des NOB, les amorces choisies présentent moins de biais : le gène *nxrA* n'est présent qu'à un seul exemplaire chez les Bactéries du genre *Nitrobacter* (PrimerBLAST, NCBI), et les amorces 16S spécifiques de *Nitrospira* sont non seulement spécifiques de ce genre bactérien, mais amplifient un seul exemplaire par génome (PrimerBLAST). Les Bactéries oxydant le nitrite ne sont donc *a priori* pas surestimées en utilisant les amorces choisies. Pour les dénitrifiantes, le problème est tout autre : le gène ciblé ne correspond pas à l'activité d'intérêt, et ne permet donc pas de savoir si les séquences amplifiées appartiennent à des Bactérie capables de produire ou d'éliminer le nitrite. En effet, les bactéries dénitrifiantes sont un groupe hétérogène, et donc les gènes de la dénitrification sont très divers (Jones et al., 2008), avec des différences structurelles pouvant conduire à nécessiter l'utilisation des jeux d'amorces très différents (Jones et al., 2011). Le gène *nrfA* est présent à 1 seul exemplaire chez les bactéries responsables de la DNRA, et les amorces *nrfA* choisies sont capables d'amplifier 85% des séquences connues (Welsh et al., 2014). Cela fait de ce gène un bon marqueur de la communauté responsable de la DNRA.

Il apparait donc que les plus grandes incertitudes concernant la quantification soient en premier lieu les Bactéries totales, puis les Bactéries dénitrifiantes, et enfin les Archées totales, ainsi que les Procaryotes oxydant l'ammonium. Les Bactéries oxydant le nitrite étudiées (*Nitobacter* et *Nitrospira*) semblent en revanche avoir une bonne corrélation entre nombre de gènes cible et nombre d'organismes. Lors de cette thèse, on utilisera donc les résultats de qPCR sur les gènes d'intérêt comme indicateur de l'abondance des communautés possédant ce gène (y compris pour les NOB). Il conviendra donc de garder cela à l'esprit lors de la discussion des résultats de quantification dans les différents environnements étudiés.

## II.7. Mesure des taux de nitrification dans la colonne d'eau

Des échantillons d'eau non filtrée (200-250 mL) sont incubés dans des erlenmeyers de 500 mL à l'obscurité à 20°C sous agitation orbitale constante (120 rpm) pendant 24 h. Deux inhibiteurs sélectifs de la nitrification ont été choisis selon Brion et Billen (1998). Le N-serve, n'étant plus commercialisé en raison de son effet cancérigène, a été remplacé par l'allythiourée (0,1 mM) pour inhiber l'oxydation de l'ammonium selon Tallec et al. (2006) ; le sodium chlorate (10 mM) permet d'inhiber l'oxydation du nitrite. Ces deux taux sont déterminés linéairement par l'augmentation ou la diminution des concentrations de nitrite en fonction du temps (20 à 22 h) (Cébron et al., 2004). En mai 2013, les échantillons de Poissy sont incubés simultanément à 10, 20 et 30°C afin d'étudier l'influence de la température sur les cinétiques de l'oxydation de l'ammonium et du nitrite.

Les incubations sont effectuées en triplicats pour des concentrations de  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_2^-$  différentes, variant entre 0 et 1000  $\mu\text{M}$  (0, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{M}$ ). Comme ces réactions sont enzymatiques, l'évolution des taux de l'oxydation de l'ammonium et du nitrite suit une cinétique de Michaelis-Menten dépendant de la concentration en substrat ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_2^-$ ). Les cinétiques sont décrites par l'équation suivante :

$$R = R_{max} \frac{[DIN]}{[DIN] + K_M}$$

R est le taux d'oxydation de l'ammonium ou de nitrite,  $R_{max}$  est le taux maximum, [DIN] est la concentration de substrat ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_2^-$ ), et  $K_m$  est la constante d'affinité pour le  $\text{NH}_4^+$  ou le  $\text{NO}_2^-$ .

Les taux d'oxydation d'ammonium et de nitrite sont tracés en fonction des concentrations en  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_2^-$  respectivement, et les paramètres cinétique ( $R_{max}$  et  $K_m$ ) sont ajustés par la méthode des moindres carrés. Les ajustements sont réalisés avec le logiciel R (<http://cran.r-project.org/>).

Les taux d'oxydation d'ammonium et de nitrite *in situ* sont ensuite recalculés grâce aux concentrations *in situ* de  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_2^-$  et la température de l'eau :

$$R_{in situ} = R_{max} \frac{[DIN]_{in situ}}{[DIN]_{in situ} + K_M} f(T_{in situ})$$

$R_{in situ}$  est le taux d'oxydation *in situ* d'ammonium ou de nitrite,  $R_{max}$  est le taux maximum,  $[DIN]_{in situ}$  est la concentration de substrat *in situ* ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_2^-$ ),  $K_m$  est la



constante d'affinité pour  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_2^-$  et  $f(T_{in situ})$  est la fonction de température définie par Brion et Billen (1998).

Des échantillons « contrôles » sont également incubés avec les deux inhibiteurs pour mesurer la production et consommation nettes de  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_2^-$ . Deux tests sont effectués sur les échantillons à Poissy en avril 2013 pour vérifier l'absence d'oxydation abiotique du nitrite et l'inhibition complète de l'oxydation du nitrite par des Procaryotes (Bactéries et Archées). Les échantillons sont incubés avec du nitrite et du chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ ) pour déterminer l'oxydation abiotique du nitrite. Pour vérifier l'inhibition complète de l'oxydation du nitrite, des expériences simultanées sont effectuées avec deux concentrations d'allylthiourée, 0,1 et 1 mM.

Pour évaluer l'impact des conditions environnementales sur l'oxydation du nitrite, la consommation du nitrite a été comparée dans de l'eau de Seine et en milieu nitrifiant. 360 mL d'eau de Seine ont été centrifugés à 500 rpm pendant 10 minutes pour récupérer les MES et les Procaryotes. Ce culot a été re-suspendu dans un volume équivalent de milieu pour bactéries nitrifiantes, avant d'être incubé 17h30 en présence de 0,1 mM d'allylthiourée. Le milieu pour bactéries nitrifiantes se compose de 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_2$ , 10 mM  $\text{NaCl}$ , 0,2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{KCl}$ , 112 mg/L HEPES, 0,5 mg/L Phenol red, et 1 mL/L de solution d'élément trace. De l'eau déminéralisée est utilisée pour compléter le volume du milieu. Le pH a été ajusté à 7,7 avec du  $\text{NaHCO}_3$  puis à 8,0 avec du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Après stérilisation du milieu par autoclavage, 1 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  par 100 mL de milieu a été ajouté. La solution d'élément trace a été préparée afin de contenir les éléments suivants : 4 292 mg/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1 988 mg/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 81 mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 17 mg/L  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 68 mg/L  $\text{ZnCl}_2$ , 33 mg/L  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 62 mg/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . De l'eau déminéralisée est utilisée pour compléter le volume nécessaire à la solution. De l'eau brute de Seine (120 mL) a été incubée 17h30 en présence de 0,1  $\mu\text{M}$  d'allylthiourée et en ajoutant 100  $\mu\text{M}$  de nitrite. Le milieu nitrifiant ou l'eau de Seine ont été prélevés au  $t_0$ , puis toutes les heures jusqu'à 4h d'incubation, puis après 17h30 d'incubation. Le nitrite a été immédiatement dosé suivant la méthode de Griess décrite en partie 1.II.3.

## **II.8. Etude des flux benthiques de nitrite**

L'étude des flux de nitrite est effectuée en triplicats, en analysant les variations des concentrations de nitrite dans l'eau présente à la surface des sédiments. Le niveau d'eau au-dessus du sédiment est ajusté à 10 cm et la bonne oxygénation de cette eau est assurée par bullage à l'air ambiant jusqu'à la fin de l'expérience. Un volume de 5 mL est prélevé dans l'eau surnageante au lancement de l'expérience  $t_0$  et est filtré sur filtre PVDF de porosité  $0,22\ \mu\text{m}$  (Millipore, USA) adapté sur une seringue. L'eau surnageante est ensuite prélevée toutes les heures jusqu'à  $t_{3h}$ . La concentration de nitrite est mesurée immédiatement au moyen de la méthode colorimétrique décrite en partie 1.II.3.

## **II.9. Profils dans le sédiment**

Pour effectuer le profil en oxygène du sédiment, un sous-échantillonnage d'une des carottes de 9 cm est nécessaire. La carotte de 9 cm de diamètre est sous-échantillonnée en une carotte de 3,5 cm de diamètre pour 20 cm de long. Le micro-senseur à oxygène OX-50 (Unisense, Danemark) est étalonné sur deux points : dans une solution saturée en air, bullée 5 mn avec de l'air ambiant, et le zéro dans une solution anoxique, bullée 5 minutes au  $\text{N}_2$ . La sonde est ensuite fixée sur une potence dotée d'un moteur capable de mouvements verticaux micrométriques. La concentration en oxygène est ensuite mesurée en triplicats pour chaque carotte tous les  $100\ \mu\text{m}$  de la surface à 3 cm de profondeur.



## 2 Le rôle du sédiment dans la dynamique du nitrite dans la Seine

Le sédiment est un compartiment important d'une rivière. En tant que tel, son étude permet de comprendre quel rôle il joue dans les cycles biogéochimiques ayant cours dans la rivière. Dans cette thèse, la relation entre le sédiment et la dynamique du nitrite dans la Seine est étudiée. Les flux benthiques de nitrite sont mesurés, ainsi que les profils en oxygène, et différents nutriments (ammonium, nitrite, nitrate et sulfate). La répartition verticale de différentes communautés appartenant au cycle de l'azote est également déterminée afin de connaître leur importance dans le sédiment aux différentes profondeurs. Le croisement des résultats obtenus pendant ces expériences doit permettre de formuler une hypothèse sur le rôle du sédiment dans la dynamique du nitrite dans la Seine, et sur l'impact d'une STEP sur le sédiment.



## I. Introduction

Le sédiment du fond des milieux aquatiques tels les lacs et rivières est le lieu de nombreuses réactions des cycles biogéochimiques (Hedges, 1992). La surface du sédiment est en effet en interaction permanente avec la colonne d'eau ce qui provoque de fortes variations physico-chimiques dans un espace réduit et favorise le développement de nombreuses réactions biogéochimiques, et le sédiment participe ainsi à l'équilibre biogéochimique des cours d'eau. En rivière, le sédiment est surtout présent dans des zones de faible débit, où les matières en suspensions se déposent dans le lit de la rivière (Kindle, 1918). Il présente en général une forte concentration en matière organique, et la consommation d'oxygène en surface induit une anoxie à faible profondeur, dès 2 mm sous la surface en général pour des sédiments fins (Ziebis et al., 1996). Cependant la profondeur de pénétration de l'oxygène peut être beaucoup plus importante suivant la structure du sédiment, avec une profondeur jusqu'à 12 cm observée dans un lac selon les travaux de Li et al. (2012). Les gradients entre la colonne d'eau et le sédiment font que les conditions physico-chimiques y sont très variées. Le sédiment comporte donc des niches écologiques favorables à un vaste éventail de Procaryotes, impliqués dans différents cycles biogéochimiques. On peut donc retrouver dans le sédiment des Procaryotes autotrophes ou hétérotrophes, aérobies ou anaérobies.

La Seine est un fleuve de basse altitude (300 m environ, seul 1% du bassin dépasse l'altitude de 550 m, notamment dans le Morvan où il culmine à 900 m). Ces altitudes modérées expliquent les faibles pentes des cours d'eau (0,01 à 0,03 m / 100m) et la vitesse d'écoulement relativement faible (1 à 2 km/h) propices à l'accumulation de sédiment (Cuvilliez et al., 2015). La Seine est un fleuve fortement anthropisé : sa colonne d'eau ainsi que son sédiment sont fortement enrichis voire pollués par l'homme (*e.g.* nutriments, pesticides, médicaments, métaux, Procaryotes). Les eaux usées domestiques sont un composant majeur de l'impact humain sur les rivières, malgré des traitements en station d'épuration (STEP). La STEP la plus importante de l'agglomération parisienne est la station Seine Aval (SAV) localisée à Achères, et Cébron et al. (2003, 2004, 2005) ont montré que ses rejets modifiaient les communautés microbiennes de la colonne d'eau de la Seine. Pendant cette période qui précédait les changements de traitements des eaux usées en 2007 (traitement secondaire de type boues activées avant 2007, puis ajout de bassins de nitrification et progressivement de dénitrification), les concentrations en nitrites augmentaient d'un facteur 2 le long de la Seine de l'aval de SAV jusqu'à l'estuaire (Garnier et al., 2007, Raimonet et al., 2015), malgré une forte abondance de bactéries oxydant le nitrite (NOB) (Cébron et Garnier,

2005). Les fortes concentrations en nitrite étaient interprétées comme une accumulation du produit intermédiaire de la nitrification de l'ammonium dans la colonne d'eau. Cependant, le sédiment et ses échanges avec la colonne d'eau peuvent aussi constituer une source de nitrites, avec plusieurs facteurs de contrôle entrant en compte (Philips et al., 2002), qu'ils soient d'origine physico-chimique ou biologique. Il existe cependant des situations où le sédiment est un puit de nitrite, ce qui contribue à diminuer la concentration de nitrite dans la colonne d'eau (Hargreaves, 1998).

Il existe deux possibilités pour expliquer la présence de nitrite dans le sédiment : une diffusion du nitrite depuis un milieu adjacent (*e.g.* colonne d'eau) ou une production endogène (*e.g.* accumulation de nitrite). La présence de nitrite dans le sédiment peut provoquer une augmentation de la concentration de nitrite dans l'eau surnageant par diffusion (Kelso et al., 1997). La matière organique a un rôle clé dans ce fonctionnement « puit ou source de nitrite » car sa dégradation par les organismes hétérotrophes provoque une compétition avec les Procaryotes nitrifiants pour l'oxygène disponible, diminuant l'efficacité de la nitrification (Kelso et al., 1999, Garcia-Robledo et al., 2013). Un excès des formes de l'azote perturbe aussi le fonctionnement du cycle de l'azote. C'est le cas de la nitrification dont la deuxième étape, l'oxydation du nitrite, est inhibée par un excès d'ammonium (Smith et al., 1997a), ou encore de la dénitrification (Nielsen et al., 2009) dont la production de  $\text{NO}_2^-$  est positivement corrélée à la concentration de  $\text{NO}_3^-$ . En outre la présence d'antibiotiques par exemple perturbe la dénitrification et provoque une surproduction de nitrite (Yan et al., 2013), ainsi que modifie la structure des communautés dénitrifiantes (Laverman et al., 2015). L'impact des STEPs n'est donc pas à négliger, dans la mesure où les effluents urbains traités sont une source importante d'azote sous plusieurs formes ainsi que de matière organique et de divers polluants (*e.g.* antibiotiques, métaux lourds, pesticides) (Schluter et al., 2007, Barber et al., 2013, Dinh et al., 2011).

La dynamique du nitrite peut être aussi perturbée par des facteurs biologiques, tels que l'apport de bactéries allochtones modifiant l'équilibre des communautés autochtones. Des travaux précédents sur la Seine ont en effet montré que les STEP de l'agglomération parisienne rejetaient des Procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote ( $10^4$  à  $10^9$  copies des gènes par L pour les AOB, *Nitrobacter* et *Nitrospira*) (Cébron et al., 2003, Cébron et al., 2004, Cébron et Garnier, 2005). Ces Procaryotes introduits ne sont par ailleurs pas nécessairement adaptés aux conditions dans la Seine. Cependant, il a été observé en aval

d'une STEP la colonisation de biofilms de rivière par un des Bactéries nitrifiantes provenant de cette STEP (Mussmann et al., 2013).

Afin de mieux comprendre le rôle du sédiment de la Seine dans la dynamique du nitrite de ce fleuve, plusieurs aspects du sédiment sont analysés, en amont et en aval des rejets de la STEP SAV. Dans un premier temps, les flux de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) entre le sédiment et la colonne d'eau sont mesurés pour déterminer si le sédiment de la Seine consomme ou produit du nitrite. Ensuite, les profils verticaux des paramètres physico-chimiques ( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) et biologiques (abondance des Procaryotes impliqués dans la dynamique du nitrite) ont été déterminés dans le sédiment. En mettant en perspective les flux de nitrite, les profils en azote, et la répartition verticale des communautés microbiennes, l'objectif est d'interpréter le rôle du sédiment dans la dynamique du nitrite en Seine, et l'importance relative des principales communautés de Procaryotes du cycle de l'azote dans ce contexte d'apports par la STEP.



## II. Matériel et méthodes

### II.1. Site d'étude et prélèvement

La Seine est un fleuve situé dans la partie nord-ouest de la France, et son bassin versant est le plus peuplé de France. La plus forte concentration de population est concentrée dans l'agglomération parisienne (11 852 900 habitants en 2011 selon l'INSEE). Deux sites de dépôts sédimentaires ont été étudiés en amont (17 octobre 2013) et en aval (18 octobre 2013) de la station d'épuration (STEP) Seine Aval (SAV) (Figure 14). Cette STEP est gérée par le 'Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne' (SIAAP). La STEP SAV reçoit 1,7 millions de m<sup>3</sup> par jour d'eaux usées qui sont traitées par nitrification couplée à la dénitrification, ayant pour but d'éliminer le nitrate sous forme de N<sub>2</sub> (Rocher et al., 2012b, Rocher et al., 2012a).

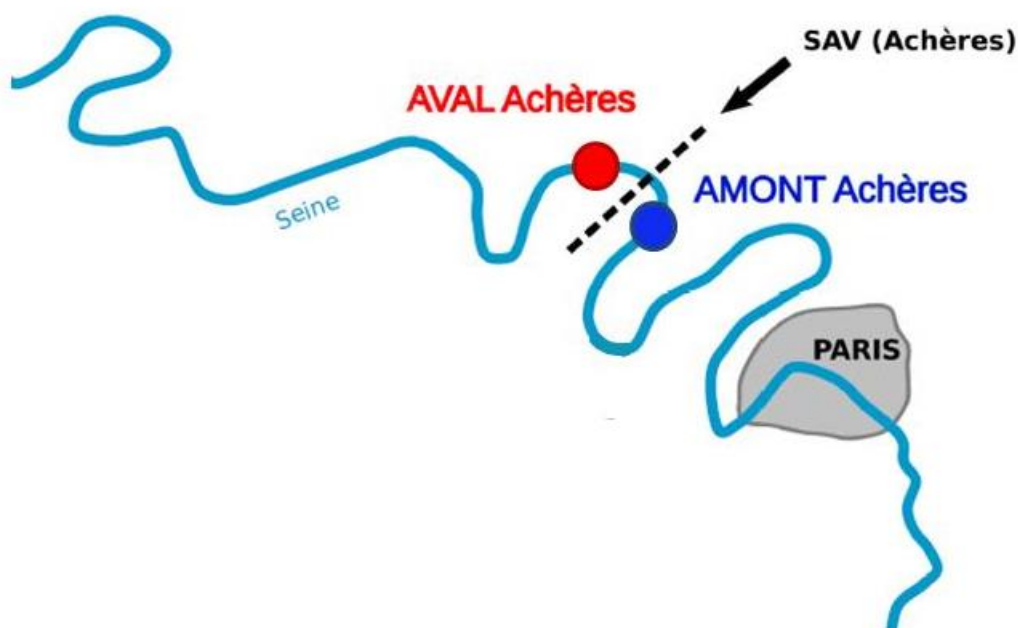


Figure 14- Carte des prélèvements de sédiment et d'eau de surface amont (en bleu) et en aval (en rouge) de la STEP SAV (situation des rejets montrée par une flèche et des pointillés).

Les sédiments ont été prélevés depuis un bateau avec le concours du SIAAP, 300 m en amont et en aval de SAV, dans des zones de dépôt de sédiment. Un carottier à gravité a été utilisé, avec des tubes en plexiglas de 1 m de long pour 9 cm de diamètre. Six carottes ont été prélevées sur chacun de deux sites, deux sont utilisées sur place pour prélever l'eau

interstitielle tous les cm sur 8 cm ainsi que l'eau surnageante au moyen de rhizons (Rhisosphere research, Pays Bas). Les quatre autres carottes ont été transportées au laboratoire pour les analyses de flux de nitrite, les profils d'O<sub>2</sub> ainsi que d'azote et de carbone total et les extractions d'ADN. Des prélèvements d'eau sont effectués simultanément en surface de la Seine. Deux bouteilles en plastique de 2 L ont été remplies d'eau en chaque site après rinçage des récipients avec l'eau du site, puis conservées à l'obscurité jusqu'au laboratoire. Une sonde multi-paramètre YSI 6920 (YSI, USA) est utilisée pour mesurer le pH, la température, la conductivité ainsi que la concentration en oxygène dissous de la colonne d'eau.

## **II.2. Prétraitement des échantillons et analyses chimiques**

Afin de mesurer la charge des eaux en matière en suspension (MES) les échantillons issus de la colonne d'eau sont homogénéisés puis filtrés sur un filtre en fibre de verre Whatman GF/C (GE Healthcare, UK) de porosité 1,2 µm pré-pesés avant d'être séchés 24 heures à 110°C. Les filtres sont ensuite repesés afin de déterminer le poids sec de MES dans l'eau à chacun des points échantillonnés. Pour éliminer les Procaryotes présents dans l'eau en vue de dosages chimiques, l'eau est homogénéisée puis filtrée sur des filtres de porosité 0,22 µm en PolyVinylidene Fluoride (PVDF) (Millipore, USA).

Les quatre carottes utilisées en laboratoire ont eu deux usages : une a été utilisée pour déterminer les profils en oxygène, et les trois autres pour mesurer les flux d'azote entre le sédiment et l'eau surnageante (flux benthique). Les trois carottes 'flux' ont été utilisées telles quelles, mais la carotte utilisée pour le profil d'oxygène a dû être reconditionnée dans une carotte plus petite afin de s'adapter à la sonde O<sub>2</sub> (Unisense, Danemark). Ce sous carottage a été effectué en carottant au moyen d'une carotte de 2,5 cm de diamètre dans la carotte initiale de 9 cm de diamètre. Cette opération a été effectuée en prenant garde à minimiser tout impact à la surface du sédiment afin d'avoir un profil en oxygène le plus fiable possible. Après les expériences, deux carottes utilisées pour les flux ainsi que la carotte utilisée pour le profil d'oxygène ont été découpées tous les cm jusqu'à 8 cm de profondeur. Les 5 mm du bord extérieur des carottes ont été jetés afin d'éliminer l'effet des transferts verticaux de sédiment le long de la paroi lors de prélèvement. Chaque cm prélevé a été homogénéisé carotte par carotte au moyen d'une spatule dans un bécher (nettoyé à l'eau puis à l'alcool entre chaque échantillon). Environ 5 cm<sup>3</sup> de chacun des échantillons préparés a été utilisé pour connaître le pourcentage d'humidité du sédiment et 5 autres cm<sup>3</sup> ont été conservés dans des sachets

hermétiques à -80°C avant extraction d'ADN. Le reste du sédiment a été conservé à -20°C puis lyophilisé, avant d'être broyé en vue d'une mesure de l'azote et du carbone total.

Les eaux interstitielles ont été utilisées pour déterminer les concentrations de nitrite, nitrate, ammonium et sulfate. La méthode utilisée pour le dosage du nitrite est la méthode colorimétrique de Griess, avec les réactifs suivant : sulfanilamide 1% m/v et *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) 0.05% m/v. Après 20 minutes de coloration dans le noir, l'absorbance à 540 nm était mesurée avec un spectrophotomètre Spectrostar nano (BMG labtech, Allemagne). Les concentrations d'ammonium, de nitrate et de sulfate ont été mesurées par photométrie et électrochimie sur un Gallery<sup>TM</sup> (Thermo Scientific).

### **II.3. Flux benthique de nitrite**

L'étude des flux de nitrite a été effectuée en triplicats, en analysant les variations des concentrations de nitrite dans l'eau surnageante des sédiments au cours d'incubations de quelques heures. Le niveau d'eau au-dessus du sédiment a été ajusté à 10 cm et la bonne oxygénation de cette eau a été assurée par bullage à l'air ambiant jusqu'à la fin de l'expérience. Les carottes prélevées sur site contenaient plus d'eau de Seine que nécessaire à l'expérience après le prélèvement (plus de 30 cm de hauteur d'eau), et l'ajustement à 10 cm d'eau surnageante a été effectué en siphonnant l'eau en excédent. L'incubation a été réalisée à température ambiante, à 20°C. Un volume de 5 mL a été prélevé dans l'eau surnageante au lancement de l'expérience et filtré sur membrane en PVDF de 0,22 µm de porosité (Millipore, USA). Ce  $t_0$  est établi au lancement de l'expérience, après environ 1h de préparation de la manipulation. L'eau surnageante est ensuite prélevée à raison de 5 mL toutes les heures (sans compensation du volume prélevé) jusqu'à 3h. La concentration de nitrite est mesurée immédiatement au moyen de la méthode colorimétrique décrite en partie 1.II.3.

### **II.4. Quantification des gènes d'intérêt**

Pour extraire l'ADN des Procaryotes présents dans le sédiment, le kit Powersoil ADN isolation Kit (MOBIO) a été utilisé en suivant le protocole du fournisseur modifié comme suit. La lyse physique est effectuée par agitation des tubes PowerBead contenant 0,25 g de sédiment et des billes de silice dans un appareil FastPrep FP120 (BIO 101) 45 secondes 2 fois à 4,5 Hz. Huit extractions ont été effectuées pour chaque carotte (3 carottes par site) et en 8 profondeurs, soit un total de 24 extractions pour l'amont de SAV et 24 extractions pour l'aval de SAV. Le kit utilisé inclut plusieurs étapes de purification qui permettent de diminuer la

présence d'inhibiteurs de PCR à des niveaux satisfaisants permettant d'utiliser l'ADN issu du sédiment dans les mêmes conditions que celui issu de l'eau.

Nous avons choisi d'utiliser le nombre de copies de l'*ARNr 16S* général (ou 16S) comme indicateur d'abondance des communautés totales Bactériennes et Archéenne. Pour ce qui concerne le nombre de bactéries, on sait que plusieurs copies du gène peuvent exister simultanément (1 à 15 dans les souches étudiées par Acinas et al. (2004)), il s'agit donc bien d'un indicateur d'abondance et non d'une abondance des organismes. Les communautés Bactériennes totales sont analysées par qPCR au moyen des amorces 63F (Marchesi et al., 1998) et BU16S4 (Muyzer et al., 1993), tandis que les communautés archéennes le sont au moyen des amorces Arch 806 (Takai et al., 2000) et Arch 916 (Stahl et Amann, 1991). De la même manière, nous définissons des indicateurs d'abondance des communautés microbiennes d'intérêt au moyen de la technique de qPCR, avec des amorces spécifiques pour les AOB (Rotthauwe et al., 1997), les AOA (Konneke et al., 2005, Tourna et al., 2008) ainsi que les Bactéries du genre *Nitrobacter* (NBC) au moyen du gène *nxrA* (Graham et al., 2007, Wertz et al., 2008) et du gène de l'*ARNr 16S* spécifique de *Nitrospira* (NSR) (Dionisi et al., 2003). Un indicateur d'abondance de la communauté dénitrifiante est obtenue à l'aide des amorces *nosZF* et *nosZ1622Rb* (Kloos et al., 2001), et celui de la communauté des Bactéries responsable de la DNRA à l'aide des amorces *nrfAF2aw* (Welsh et al., 2014) et *nrfAR1* (Mohan et al., 2004). Deux types de mix sont utilisés : le mastermix LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) ou Sensifast SYBR No-Rox (Bioline, Royaume Uni) pour les qPCR sans sonde TaqMan, et le mastermix SensiFact Probe No-Rox (Bioline, Royaume Uni) pour les qPCR avec sonde TaqMan. Les réactions de qPCR ont toutes été effectuées en triplicats dans un milieu réactionnel de 10 µL, dans un appareil LightCycler 480 (Roche, Suisse). Les résultats bruts sont analysés grâce au logiciel LightCycler 480 (Roche, Suisse) selon la méthode de dérivée seconde après vérification de la bonne amplification par « melting curve » (pour les qPCR sans sonde). Une efficacité de réaction entre 1,8 et 2 est attendue, consistant en un doublement de l'intensité lumineuse entre 2 cycles d'amplification, avec une erreur attendue inférieure à 0,2 (régression linéaire de la moyenne des erreurs au carré).

Concernant la représentativité des différents indicateurs moléculaire utilisés en qPCR, on pourra se référer à la partie 1.II.6, spécificité et pertinence des amorces, afin de mieux appréhender la comparaison des groupes microbiens entre eux. Les amorces utilisées ont en effet des spécificités différentes, et les groupes étudiés ont un nombre d'opéron par génome différent, ce qui conduit à une différence entre le nombre de copie de gènes obtenus en qPCR

et l'abondance d'organisme dans l'échantillon. L'analyse de cette différence permet de comprendre dans quelle mesure les observations de l'abondance des indicateurs (gènes 16S ou fonctionnels en qPCR) se traduisent en abondance (réelle) des différents groupes microbiens.

## **II.5. Tests statistiques**

La significativité des résultats obtenus est vérifiée au moyen de tests statistiques. Un test non paramétrique Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) est utilisé pour déterminer les différences entre les échantillons d'un groupe (*e.g.* différentes profondeurs) sont significatives avec le logiciel SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA). Des analyses plus approfondies sont effectuées par des comparaisons d'échantillons appariés (test Tukey  $p < 0,05$ ) pour déterminer les variations au sein d'un groupe d'échantillons. Pour comparer deux groupes (*e.g.* amont et aval), un test non paramétrique Mann-Whitney est utilisé. Enfin, on compare plusieurs profondeurs d'un site par comparaison de multiples échantillons appariés (test Holm-Sidak  $p < 0,05$ ).

### III. Résultats

#### III.1. Caractéristiques physico-chimiques du sédiment

Les sédiments prélevés en amont et en aval d'Achères ont des textures différentes. Alors que les sédiments prélevés en amont sont sablonneux, les sédiments prélevés en aval ont un aspect plus vaseux, avec de fortes odeurs d'hydrocarbures. Le contenu en eau (massique) est également différent dans ces deux sédiments. Il varie entre 36% en surface et 31% à 8 cm de profondeur en amont, tandis qu'en aval il varie entre 73% en surface et 50% à 8 cm de profondeur (Figure 15), et ces variations sont significatives (Shapiro-Wilk  $p < 0.001$ ). La porosité (volumique) peut ainsi être estimée grâce à l'équation  $(P_m \cdot \rho_S) / (1 - P_m + P_m \cdot \rho_S)$  où  $P_m$  est la fraction massique de l'eau (contenu en eau) et  $\rho_S$  est la densité du sédiment (approximée à 2,65 selon Jaffe et Ferrara 1984). On obtient ainsi une porosité de 0,60 dans le premier cm du sédiment en amont, et de 0,88 dans le premier cm en aval. La concentration en matière en suspension (MES) de l'eau surnageante augmente entre l'amont et l'aval d'Achères : 16,5 mg.L<sup>-1</sup> en amont et 22,4 mg.L<sup>-1</sup> en aval.

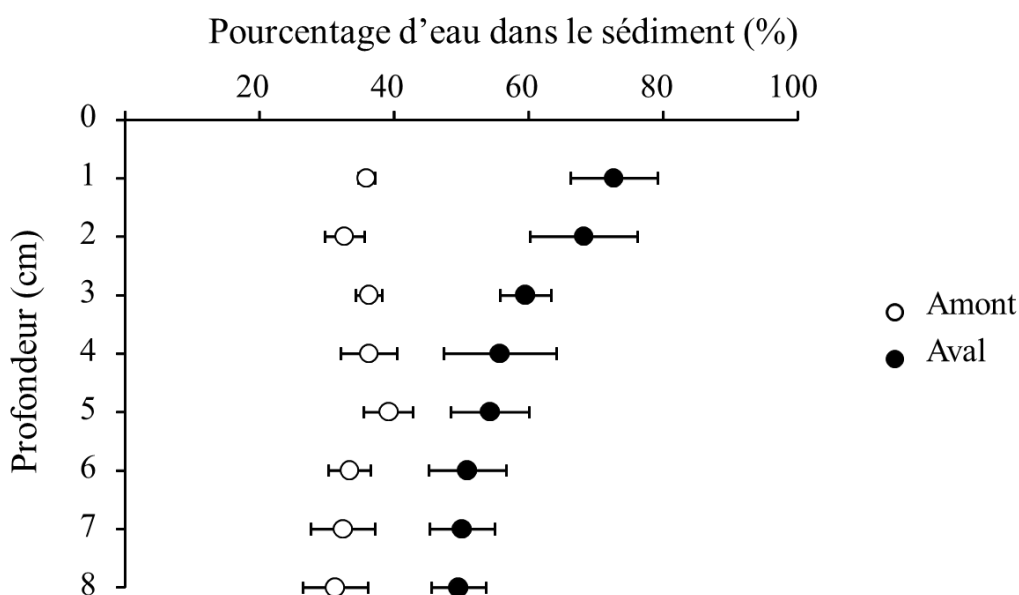


Figure 15- Contenu en eau dans les sédiments prélevés en amont (en blanc) et en aval (en noir) de la STEP, représenté par la moyenne de triplicats et de l'écart type pour le pourcentage d'eau (m/m).

En amont d'Achères, l'oxygène pénètre jusqu'à une profondeur de 2,4 mm, et 2,1 mm en aval (Figure 16), ce qui est assez proche au regard du pas centimétrique utilisé pour les

profils des formes de l'azote évoqué dans la partie suivante. Ces profils ne montrent donc pas de différence significative entre carottes amont et aval, d'autant qu'une variabilité notable est obtenue pour les carottes en aval.

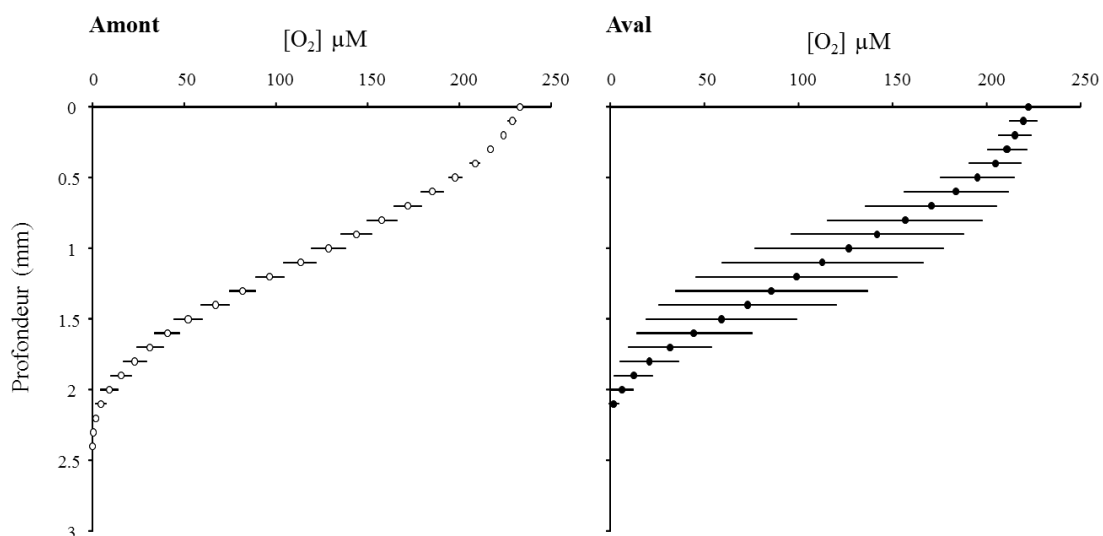


Figure 16- Profils de l'oxygène ( $O_2$ ) dans le sédiment en amont et en aval de la STEP SAV, moyenne et écart type.

### III.2. Flux de nitrites à l'interface sédiment-eau et profil des formes de l'azote

L'impact des communautés microbiennes benthiques sur la colonne d'eau peut être mesuré en prenant en compte les échanges entre le sédiment et l'eau surnageante. Les flux de nitrite obtenus en amont et en aval d'Achères par des incubations de carottes de sédiments sont similaires : le sédiment apparaît comme une source de nitrite dans les deux cas, avec un flux sortant de  $+0,29 \mu\text{mole/h NO}_2^-$  en amont et de  $+0,27 \mu\text{mole/h NO}_2^-$  en aval (pente de la courbe moyenne sur la Figure 17). Le diamètre interne des carottes étant connu (8,4 cm), ce flux peut également être exprimé par unité de surface en divisant le flux sortant par la surface de contact entre le sédiment et l'eau ( $\text{surface} = \pi r^2$ ). En amont de SAV, le flux benthique a été estimé en moyenne à  $52 \mu\text{mol/m}^2/\text{h}$  ( $\pm 10$ ), et en aval de SAV à  $49 \mu\text{mol/m}^2/\text{h}$  (Figure 17). Afin de déterminer l'origine de cette production de nitrite, les concentrations d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ont été mesurées tous les centimètres dans le sédiment jusqu'à 8 cm de profondeur, ainsi que dans l'eau surnageante.

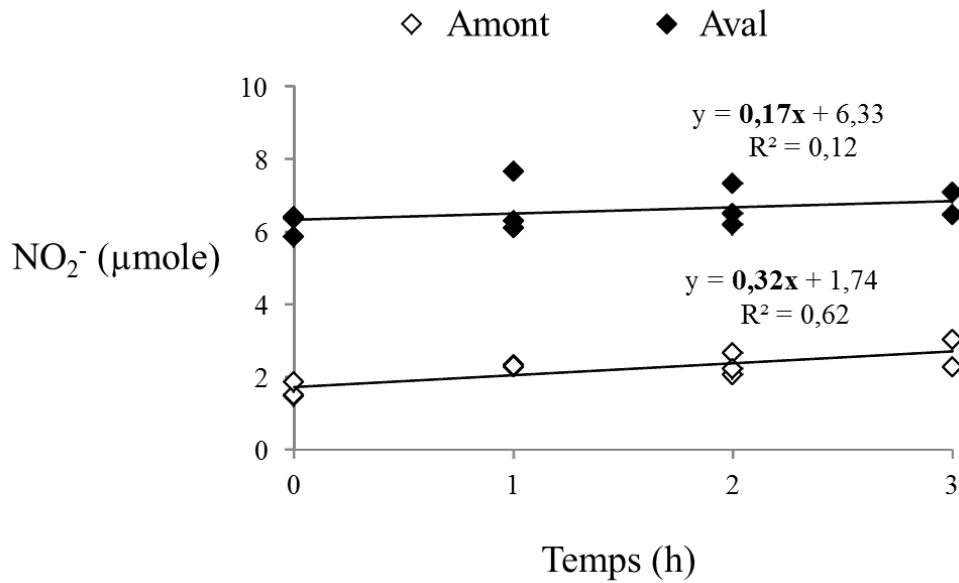


Figure 17 - Variation temporelle (h) de la quantité totale de nitrite (en  $\mu\text{mole}$ ) dans l'eau surnageante pour le sédiment prélevé en amont ou en aval de la STEP SAV (triplicats). Ce graphe représente la quantité totale de nitrite présente dans le milieu, afin d'évaluer plus facilement la production ou la consommation du nitrite par le sédiment. L'équation de la courbe de tendance ainsi que le  $R^2$  sont indiqués au-dessus de la courbe associée à chaque expérience en triplicat.

On peut estimer les flux de nutriment *in situ* à partir des concentrations dans l'eau surnageante et dans le sédiment en utilisant la première loi de Fick (Lavery et al., 2001) :

$$F = -\varphi D \frac{\delta C}{\delta z}$$

Où  $F$  est le flux en  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{s}$ ,  $\varphi$  est la porosité du sédiment ( $\text{L}/\text{L}$ ),  $D$  le coefficient de diffusion de l'ion ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $C$  la concentration ( $\mu\text{mole}/\text{m}^3$ ) et  $z$  la profondeur dans le sédiment (m). En outre, pour tenir compte de la tortuosité des sédiments qui influe également sur la diffusion, et en utilisant différentes formules empiriques qui la relient à la porosité (Shen et Chen, 2007), nous appliquerons un facteur correctif égal à  $\varphi$  également, soit finalement

$$F = -\varphi^2 D \frac{\delta C}{\delta z}$$

Les concentrations en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), varient entre  $3,8 \mu\text{M NO}_2^-$  dans l'eau surnageante en amont et  $10,6 \mu\text{M NO}_2^-$  en aval d'Achères (Figure 18), ce qui correspond effectivement aux valeurs mesurées à  $t_0$  dans l'expérience d'incubation des carottes. En amont d'Achères, la concentration moyenne de nitrite augmente dans le sédiment d'environ  $4 \mu\text{M NO}_2^-$  pour atteindre un pic à 3 cm de profondeur à  $11,6 \mu\text{M NO}_2^-$  et diminuer à  $2,6 \mu\text{M NO}_2^-$  à 8 cm de profondeur. En aval, la concentration moyenne de nitrite diminue fortement dans le sédiment,



à partir d'un maximum de  $10,2 \mu\text{M NO}_2^-$  dans le premier centimètre vers une concentration de nitrite comprise entre  $2,2$  et  $1,4 \mu\text{M NO}_2^-$  au-delà de  $3 \text{ cm}$ . Les barres horizontales montrent la forte hétérogénéité observée en amont pour les profils de nitrite dans les 2 carottes étudiées, en aval les 2 carottes ont un profil plus proche. Les informations fournies par Li et Gregory (1974) permettent d'estimer un coefficient de diffusion pour l'ion nitrite pour une température de  $13^\circ\text{C}$ , soit  $13,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ . En prenant en compte les zones de fort gradient entre  $1$  et  $3 \text{ cm}$  de profondeur, à l'amont comme à l'aval, on peut y estimer des flux diffusifs qui sont de  $0,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$  en moyenne et vers la surface dans la carotte amont et de  $1,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$  vers la profondeur dans la carotte aval. Ces flux calculés à partir des profils des concentrations d'eau interstitielle sont bien moindres que ceux mesurés expérimentalement en aval de SAV ( $49 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$ ) et en amont ( $52 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h} \pm 10$ ), tous deux vers la colonne d'eau, dans un rapport de  $30$  à  $80$ .

On notera que ces estimations sont entachées d'une forte incertitude, particulièrement évidente sur les carottes collectées à l'amont comme en témoigne la variabilité des concentrations mesurées dans les deux carottes étudiées. Au voisinage de l'interface eau-sédiment, les profils se redressent avec des valeurs de concentration à  $1 \text{ cm}$  de profondeur très proches des valeurs mesurées dans l'eau surnageante.

La concentration moyenne d'ammonium en aval d'Achères dans l'eau surnageante (Figure 14) est presque trois fois supérieure à celle mesurée en amont ( $69,7 \mu\text{M NH}_4^+$  en aval contre  $24,5$  en amont  $\mu\text{M NH}_4^+$ ). Dans les sédiments des deux sites, une augmentation régulière de la concentration moyenne en ammonium est observée en fonction de la profondeur. Cependant, cette augmentation est plus importante en aval où elle atteint  $1535 \mu\text{M NH}_4^+$  à  $6 \text{ cm}$  de profondeur pour légèrement décroître à  $1327 \mu\text{M NH}_4^+$  à  $8 \text{ cm}$  de profondeur. En amont après une légère diminution dans le premier centimètre du sédiment, l'augmentation des concentrations en  $\text{NH}_4^+$  est progressive, de  $20 \mu\text{M NH}_4^+$  jusqu'à  $165 \mu\text{M NH}_4^+$  à  $8 \text{ cm}$  de profondeur. Les profils en ammonium obtenus en amont sont bien homogènes pour les 2 carottes étudiées, alors qu'on observe une plus forte disparité entre les 2 carottes prélevées en aval. On utilise un coefficient de diffusion de  $14,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  à  $13^\circ\text{C}$  (Li et Gregory, 1974). On obtient alors pour l'ammonium, dans les carottes amont un flux vers le haut de  $4,9 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$  dans la partie de la carotte située entre  $3$  et  $8 \text{ cm}$  de profondeur, et dans les carottes en aval un flux d'ammonium d'environ  $62,8 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$  vers le haut également, et sensiblement dans toute la carotte.

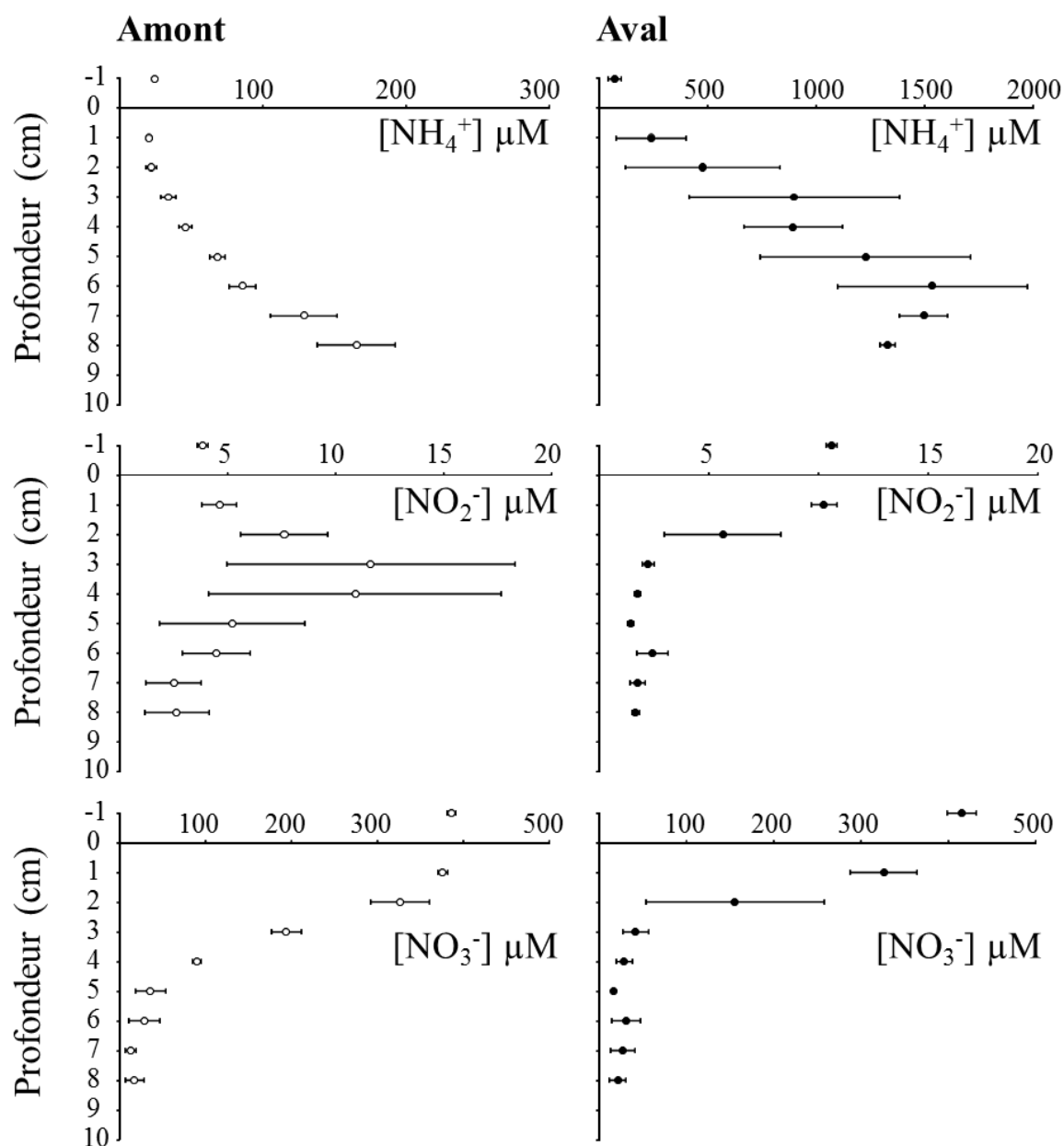


Figure 18 - Profil de l'ammonium  $[NH_4^+]$  du nitrite  $[NO_2^-]$  et du nitrate  $[NO_3^-]$  en  $\mu M$  dans l'eau surnageante (-1 cm) ainsi que dans l'eau interstitielle (1-8 cm) en amont et en aval de la STEP SAV. La moyenne des duplicats est représentée par un cercle, avec les valeurs obtenues dans les 2 carottes pour chaque site sont représentées par la dispersion, alors que les sites sont représentés par des couleurs différentes (amont en blanc et aval en noir).

Les concentrations en nitrate ( $NO_3^-$ ) sont importantes dans l'eau surnageante, mais relativement proches en amont et en aval d'Achères : 386  $\mu M$   $NO_3^-$  en amont contre 415  $\mu M$   $NO_3^-$  en aval (Figure 18). La concentration en nitrate dans le sédiment diminue en amont et en aval, avec cependant une diminution plus rapide en aval qu'en amont. En amont, la concentration diminue peu entre l'eau surnageante et le premier centimètre de sédiment,

(375  $\mu\text{M NO}_3^-$ ). La diminution est ensuite assez rapide jusqu'à la profondeur 5 cm, où le nitrate a une concentration de 36  $\mu\text{M NO}_3^-$  et diminue encore lentement, jusqu'à 17  $\mu\text{M NO}_3^-$  à 8 cm de profondeur. En aval, cette diminution est plus forte et observable dès le premier centimètre, où la concentration est mesurée à 325  $\mu\text{M NO}_3^-$  (de 90  $\mu\text{M NO}_3^-$  inférieur à l'eau surnageante). La diminution continue jusqu'à 3 cm de profondeur, où la teneur en nitrate atteint 41  $\mu\text{M NO}_3^-$ , puis elle est plus faible jusqu'à 8 cm de profondeur avec une concentration de 20  $\mu\text{M NO}_3^-$ . Les profils de nitrate obtenus en amont et en aval sont similaires pour les 2 carottes étudiées pour chaque site. En tenant compte d'un coefficient de diffusion de  $13,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (Li et Gregory, 1974) pour une température de  $13^\circ\text{C}$ , on peut estimer les flux de nitrate vers le bas dans la zone de profil sensiblement linéaire de 1 à 3 cm pour les carottes aval et 1 à 5 cm pour les carottes amont à des ordres de grandeur de 25  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{h}$ . La valeur du flux calculé entre le 1<sup>er</sup> et le 5<sup>ème</sup> cm est de 15,2  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{h}$  de  $\text{NO}_3^-$  en amont, et de 54,7  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{h}$  de  $\text{NO}_3^-$  en aval entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> cm.

### III.3. Communautés microbiennes du sédiment

#### III.3.1. L'ensemble des communautés microbiennes.

Les indices d'abondance pour les communautés microbiennes (bactériennes et archéennes) varient peu en abondance le long des 8 cm étudiés. L'indice d'abondance bactérienne (*ADNr 16S*) montre une plus forte valeur en aval d'Achères (1,2 et 2,9  $10^{10}$  copies/g sédiment sec) qu'en amont (0,25 et 0,43  $10^{10}$  copies/g sédiment sec), et ces valeurs varient très peu en fonction de la profondeur des carottes (Figure 19). Pour l'indice archéen (*ADNr 16S*), l'écart est significativement plus faible entre amont et aval (Mann-Whitney  $p < 0,05$ ), et les variations en fonction de la profondeur sont également faibles. En amont, l'abondance du gène de l'*ARNr 16S* archéen est en effet comprise entre 3,0 et 5,8  $10^9$  copies/g sédiment sec (Figure 19), tandis qu'en aval l'abondance de ce même gène est comprise entre 5,5  $10^9$  et 1,5  $10^{10}$  copies/g sédiment sec (Figure 19).

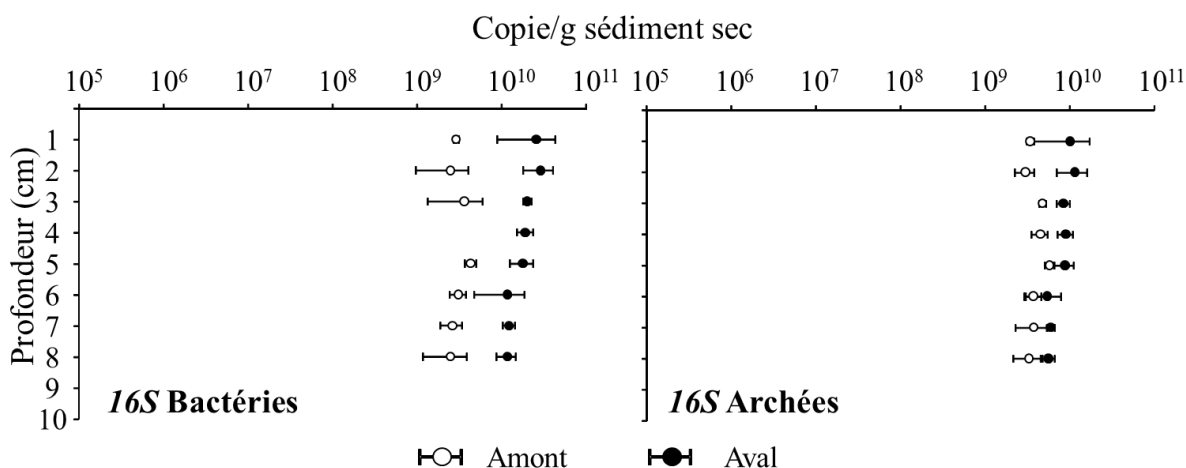


Figure 19 - Abondance des gènes de l'ARNr 16S des Procaryotes (Bactéries et Archées) totaux (copie de gène/g sédiment sec) sur une échelle logarithmique dans le sédiment en fonction de la profondeur. Les données ont été acquises en triplicat (3 échantillons, moyenne et écart type).

### III.3.2. Les communautés microbiennes nitrifiantes.

Parmi les nitrifiantes en amont du site de SAV, les quatre groupes explorés ont un indice d'abondance similaire sur les 10 cm des carottes prélevées en amont d'Achères ( $10^6$  à  $10^7$  copies/g sédiment sec). L'abondance du gène *amoA* est de  $1,8 \cdot 10^6$  ( $\pm 0,4$ ) copies/g sédiment sec comme indicateur d'abondance pour les AOB (Figure 20), et de  $8,2 \cdot 10^6$  ( $\pm 2,1$ ) copies/g sédiment sec pour les AOA (Figure 20). Concernant les NOB, l'abondance du gène *nxrA* comme indicateur d'abondance pour *Nitrobacter* est de  $3,3 \cdot 10^6$  ( $\pm 0,8$ ) copies/g sédiment sec (Figure 20), et l'abondance du 16S spécifique comme indicateur d'abondance pour *Nitrospira* est de  $2,9 \cdot 10^6$  ( $\pm 1,0$ ) copies/g sédiment sec (Figure 20).

En aval d'Achères, l'abondance du gène *amoA* indicateur des AOB diminue significativement (Holm-Sidak  $p < 0,05$ ) de  $1,1 \cdot 10^8$  copies/g sédiment sec dans le premier centimètre à  $0,15 \cdot 10^8$  copies/g sédiment sec à 8 cm (Figure 20). Le gène *amoA* indicateur des AOA est relativement stable suivant la profondeur des carottes de sédiment, quantifié à  $2,5 \cdot 10^6$  ( $\pm 1,0$ ) copies/g sédiment sec (Figure 20). Le gène *nxrA* indicateur du genre *Nitrobacter* est également stable, et présent en abondance légèrement plus importante,  $4,2 \cdot 10^7$  ( $\pm 1,5$ ) copies/g sédiment sec (Figure 20). L'indicateur du genre *Nitrospira* diminue drastiquement le long des carottes de sédiment en aval d'Achères : son abondance diminue significativement (Holm-Sidak  $p < 0,05$ ) de  $1,5 \cdot 10^{10}$  copies/g sédiment sec au premier centimètre à  $4,9 \cdot 10^8$  copies/g sédiment sec à 8 cm de profondeur (Figure 20).

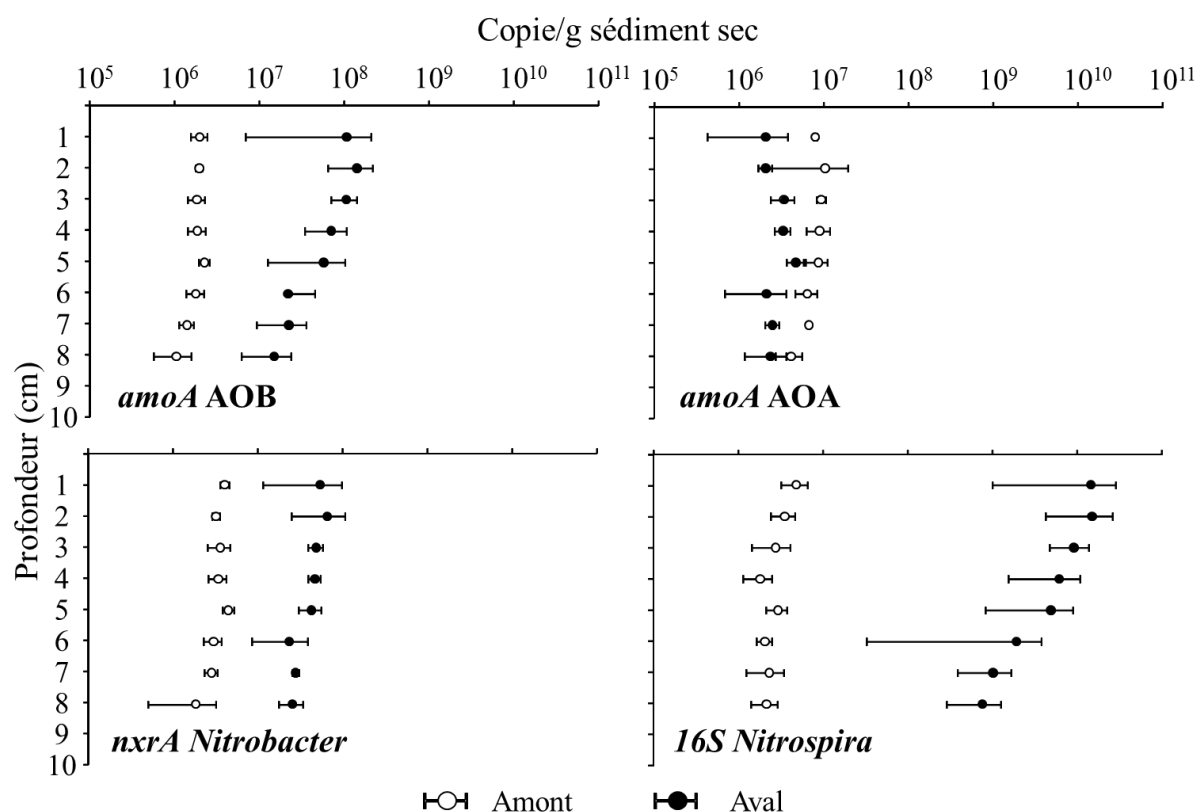


Figure 20 - Abondance des gènes indicateurs des Procaryotes nitrifiants (copie de gène/g sédiment sec) sur une échelle logarithmique dans le sédiment en fonction de la profondeur. Les données ont été acquises en triplicats (3 échantillons et 3 mesures par échantillon, moyenne et écart type). Pour une estimation plus précise du nombre d'organisme, se référer à la partie 1.II.6.

### III.3.3. Les communautés microbiennes dénitrifiantes et DNRA.

Les groupes impliqués dans la dynamique du nitrite en conditions anoxiques sont représentés majoritairement par les bactéries dénitrifiantes. Leur indice est relativement stable en fonction de la profondeur des carottes de sédiment. L'abondance du gène *nosZ* des dénitrifiantes est de  $2,6 \cdot 10^9 (\pm 0,6)$  copies/g sédiment sec en amont, et de  $6,0 \cdot 10^9 (\pm 2,2)$  copies/g sédiment sec en aval (Figure 21). L'indice d'abondance des bactéries impliquées dans la DNRA (dissimilatory nitrate reduction to ammonium) est également stable en fonction de la profondeur, mais plus faible d'un ordre de grandeur que celle des dénitrifiantes. L'abondance du gène *nrfA*, indicateur des bactéries DNRA est en effet de  $1,4 \cdot 10^8 (\pm 0,3)$  copies/g sédiment sec en amont, et de  $1,1 \cdot 10^8 (\pm 0,5)$  copies/g sédiment sec en aval (Figure 21).

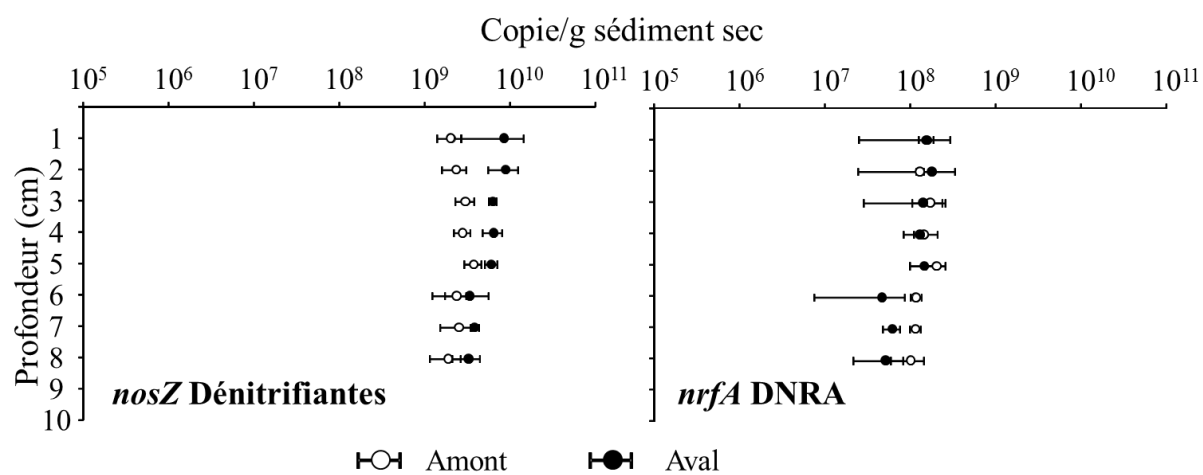


Figure 21 - Abondance des gènes indicateurs des Procaryotes dénitrifiants et responsables de la DNRA (copie de gène/g sédiment sec) sur une échelle logarithmique dans le sédiment en fonction de la profondeur. Les données ont été acquises en triplicats (3 échantillons, moyenne et écart type). Pour une estimation plus précise du nombre d'organisme, se référer à la partie I.II.6.

## IV. Discussion

Il convient en premier lieu de remarquer que les résultats obtenus sur le sédiment sont issus d'un prélèvement unique sur 2 sites relativement proches, séparés par le point de rejet d'une STEP. S'il est probable que la répartition et l'indice d'abondance des différentes communautés bactériennes soient assez stables temporellement, les flux sont plus variables (un facteur 4-5 pour des températures variant de 9 °C à 21 °C, Chestérikoff et al. 1992). Outre les différences obtenues entre les deux méthodes d'évaluation (à partir de carottes expérimentales et des profils de concentrations des eaux interstitielle), les flux présentés ici ont probablement une portée limitée puisqu'ils ne concernent que le comportement du sédiment à la mi-octobre 2013. Il conviendra donc pour interpréter valablement ces résultats d'augmenter le nombre de prélèvements, tant au niveau temporel que spatial, afin de déterminer si les observations faites pour cette campagne sont une règle ou une exception.

### *Dynamique de l'azote dans les sédiments*

Les profils de nitrite obtenus dans les sédiments prélevés dans la Seine en Octobre 2013 montrent une disparité des flux de nitrite entre les carottes. En amont on observe une source de nitrite située entre 3 et 4 cm de profondeur, d'intensité et de position variable entre les différentes carottes étudiées, et diffusant en moyenne vers le haut entre le 3<sup>ème</sup> et le 1<sup>er</sup> cm et vers le bas en dessous du 4<sup>ème</sup> cm. En aval, le flux de nitrite est dirigé vers le bas à partir du 1<sup>er</sup> cm, suggérant une diffusion de nitrite depuis l'interface eau/sédiment. Malgré une direction des flux de nitrite différents dans le sédiment en amont et en aval (vers la surface en amont et vers la profondeur en aval), les résultats des incubations montrent que le sédiment est une source de nitrite pour la colonne d'eau, en amont comme en aval de la STEP. De plus, les valeurs des flux obtenues à partir des concentrations des eaux interstitielles du sédiment sont très inférieures aux valeurs de flux observées lors des incubations (des flux de l'ordre de 1  $\mu\text{mole/h/m}^2$   $\text{NO}_2^-$  pour les premières, et de l'ordre de 50  $\mu\text{mole/h/m}^2$   $\text{NO}_2^-$  pour les secondes). L'application du calcul de flux par diffusion à l'interface eau-sédiment conduirait à un flux encore plus faible en appliquant les coefficients de diffusion moléculaire car les gradients verticaux sont très limités à l'interface. Toutefois, dans un milieu relativement agité comme la Seine, il est très clair que des effets diffusifs importants (*e.g.* turbulence, effet du passage des bateaux, et épisodes de crue) dominent la diffusion moléculaire en surface et ne permettent finalement pas d'estimer directement des flux à l'interface à partir de gradients de concentrations de l'eau interstitielle. Les flux obtenus dans les années 1990 à partir de

mesures en cloches à sédiment ne peuvent pas non plus être comparés, les conditions ayant d'épuration ayant été considérablement améliorées, les flux d'ammonium d'alors, aussi vers la colonne d'eau, atteignant à l'aval de la STEP SAV, des valeurs de l'ordre de 10 à 50 mmol/m<sup>2</sup>/h, et les flux de nitrates, vers les sédiments, s'élevant à 1 à 3 mmol/m<sup>2</sup>/h (Chestérikoff et al., 1992).

L'augmentation des concentrations en nitrite dans l'eau surnageant les carottes de sédiment au cours de l'essai d'incubation est de l'ordre de 0,3 à 0,6 µM/h, ce qui est nettement supérieur, sensiblement d'un facteur 10, aux vitesses de formation de nitrite par nitrification à partir de l'ammonium évaluées dans la colonne d'eau dans les chapitres suivants. La prise en compte d'un flux de nitrification à l'interface à partir de l'ammonium qui diffuse depuis le sédiment, dans la colonne d'eau oxygénée au-dessus du sédiment et en présence d'une quantité importante de micro-organismes nitrifiants à la surface du sédiment est donc plausible. Une partie de l'ammonium issu des sédiments pourrait également être oxydé jusqu'au nitrate (voir par exemple Nielsen *et al.*, 2009), mais d'une part nous n'avons pas les données de nitrate au cours des incubations pour le prouver et d'autre part les flux de production de nitrite mesurés au cours des incubations sont de l'ordre de grandeur des flux d'ammonium produits par les carottes, la nitrification jusqu'au stade nitrite seulement suffit donc à les expliquer.

Les flux de nitrite en provenance du sédiment évalués par incubation sont d'intensité comparable malgré des conditions différentes en amont et en aval. Le sédiment émet environ 1 200 µmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup> (50 µmol/h/m<sup>2</sup>\*24h) pour des concentrations de nitrite dans la Seine de 4 000 µmol/m<sup>3</sup> et 10 000 µmol/m<sup>3</sup> respectivement en amont et aval de la STEP. Sachant que la colonne d'eau est de 5 m de hauteur en amont et de 4 m en aval, on a respectivement une quantité totale de 19 000 µmol de nitrite au-dessus d'un m<sup>2</sup> de sédiment en amont et 42 400 µmol de nitrite au-dessus d'un m<sup>2</sup> de sédiment en aval. Dans les conditions présentes au cours de notre échantillonnage, et en supposant la couverture sédimentaire homogène dans le lit de la Seine (en réalité la partie centrale, naviguée, du cours de la Seine présente beaucoup moins de sédiment), le sédiment produirait donc 6 % du nitrite présent dans la colonne d'eau en une journée en amont (1200 µmol / 19 000 µmol \* 100), et 2% en aval (1200 µmol / 42 400 µmol \* 100). Il a été montré par Raimonet et al. (2015) via la modélisation que le sédiment de la Seine a un comportement variable vis-à-vis du flux de nitrite. Les résultats expérimentaux obtenus par Raimonet et al. (en révision) montrent un comportement de puit de nitrite pour le sédiment, en moyenne, avec des variations suivant les



sites et les saisons. Nos observations faites en octobre 2013 en amont et en aval de SAV montrent que le sédiment est une source de nitrite et des expériences de nitrification et dénitrification impliquant l'interface eau-sédiments permettraient de hiérarchiser l'importance de chacun des processus. Les profils en ammonium, nitrite, nitrate et oxygène sont différents entre l'amont et l'aval au cours des expérimentations que nous avons menées en Seine, suggérant un fonctionnement différent du cycle de l'azote. En amont, le profil de nitrite dans le sédiment montre un pic de nitrite entre 3 et 4 cm de profondeur en amont de la STEP, dans le sédiment anoxique, impliquant que les réactions anaérobies comme la dénitrification, la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA), ou l'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) sont actives et incomplètes pour générer cet excédent de nitrite. Les flux d'ammonium en provenance de la profondeur du sédiment diminuant fortement entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> cm pourraient indiquer une activité anammox, consommant de l'ammonium et du nitrate en conditions anoxiques. En aval de la STEP en revanche, le nitrite est présent en dès le premier cm du sédiment avec des concentrations équivalentes à celles du pic obtenu dans les carottes amont. Ces concentrations sont aussi similaires aux concentrations observées dans la colonne d'eau au cours des prélèvements. C'est donc un flux de nitrite du premier cm du sédiment vers la profondeur qui est observé dans les carottes de l'aval, avec une dynamique parallèle à celle du nitrate, les deux profils étant similaires. En milieu contenant de fortes quantités de matière organique, la consommation de nitrate peut basculer de la dénitrification vers la DNRA (Gardner and McCarthy, 2009), provoquant une accumulation de nitrite, la DNRA ayant été montré comme un acteur important de l'accumulation de nitrite (Kelso et al., 1999, Stevens et al., 1998). Compte tenu d'une compétition pour l'oxygène entre les Procaryotes hétérotrophes et nitrifiants (Garcia-Robledo et al., 2013, Kelso et al., 1999) avec un excès de matière organique, les oxydants du nitrite plus sensibles que les oxydants de l'ammonium au manque d'oxygène (Wang and Yang, 2004), peuvent conduire à une production de nitrite supérieure à son élimination. Les rejets de Procaryotes (hétérotrophes ou non) ainsi que de matière organique par la STEP pourraient expliquer que le nitrite ne soit pas consommé plus rapidement que le nitrate lors de la diffusion depuis la colonne d'eau dans les carottes prélevés à l'aval de la STEP.

En ce qui concerne l'ammonium, les progrès dans le traitement de l'azote dans la STEP ont permis de réduire considérablement les rejets en ammonium dans la Seine (Aissa-Grouz et al., 2015), ce qui explique que la différence en  $[\text{NH}_4^+]$  entre l'amont et l'aval soit désormais peu marquée dans la colonne d'eau. En revanche, la plus forte quantité

d'ammonium dans le sédiment en aval est probablement liée à la dégradation de la matière organique rejetée par la STEP (Malcolm et al., 1986) et accumulé depuis de nombreuses années. On observe en effet un flux vers le haut dans la profondeur du sédiment en amont comme en aval, mais tandis que ce flux est observable tout le long de la carotte en aval (du 8<sup>ème</sup> au 1<sup>er</sup> cm) et est nettement plus intense, il s'interrompt avant la surface en amont (2<sup>ème</sup> cm de la carotte). Nous pouvons interpréter cette interruption comme la manifestation possible d'un processus anammox en raison de la production simultanée de nitrite en présence de nitrate mais en anoxie.

Les profils en nitrate dans le sédiment sont par contre assez similaires entre l'amont et l'aval de la STEP, avec cependant une diminution légèrement plus rapide en aval que l'on peut expliquer par une activité de réduction du nitrate logiquement plus intense qu'en amont dans un environnement enrichi par les rejets traités de SAV. On observe en effet des flux de nitrate de la surface vers la profondeur en amont comme en aval, avec une profondeur de pénétration plus importante en amont qu'en aval (5 cm contre 3 cm), montrant l'importance de la dénitrification.

### ***Les Procaryotes des sédiments***

Les STEPs sont une source de Procaryotes dans l'environnement, que ce soit en Procaryotes hétérotrophes qui se développent dans les bassins d'aérations et biofiltres aérés ou en Procaryotes d'origine fécale (Haller et al., 2009, Servais et al., 2007) ou appartenant au cycle de l'azote (Cébron et Garnier, 2005, Cébron et al., 2004). Il a de plus été montré que les zones de faible débit en aval d'une STEP concentrent ses rejets (Wakelin et al., 2008) et que les organismes qui les accompagnent sont capables de coloniser le milieu naturel et d'y survivre (Haller et al., 2009, Mussmann et al., 2013). L'augmentation des Procaryotes dans le sédiment en aval de la STEP est donc probablement liée à deux facteurs : 1) l'accumulation dans le milieu d'organismes originaires de la STEP qui utilise des traitements biologiques basés sur la nitrification et la dénitrification, 2) la prolifération des organismes hétérotrophes par consommation de la matière organique rejetée par la STEP. La zone de prélèvement choisie pour les sédiments en aval de la STEP SAV est en effet une zone d'impact maximal (chimique et biologique), permettant d'observer pleinement l'effet de la STEP sur le sédiment.

La première constatation est que tous les groupes microbiens impliqués dans la dynamique du nitrite ont un indice d'abondance plus élevé en aval de SAV qu'en amont, à

toutes les profondeurs (figure 22). On constate également que des variations sur la verticale sont visibles en aval de SAV, alors qu'elles sont minimales en amont.

En amont de la STEP, les dénitrifiantes sont les plus importantes dans le sédiment, l'abondance de leur gène indicateur étant plus grande d'un facteur 10 par rapport aux autres Procaryotes impliqués dans la dynamique du nitrite (nitrifiants + DNRA) et cette importance est relativement stable en profondeur (de 11 au 1<sup>er</sup> cm à 19 fois au 7<sup>ème</sup> cm). Ceci pourrait indiquer que la dénitrification domine le cycle de l'azote dans le sédiment en amont de la STEP. Une telle abondance de dénitrifiantes a déjà été observée dans un sédiment eutrophe par Wang et al. (2013) qui ont quantifié le gène *nosZ* à  $10^9$  copies/g sédiment sec. L'abondance des autres groupes du cycle de l'azote dans le sédiment amont est plus faible et est également stable sur la profondeur ( $10^7$  copies/g sédiment sec pour les nitrifiantes et  $10^8$  pour copies/g sédiment sec pour les DNRA).

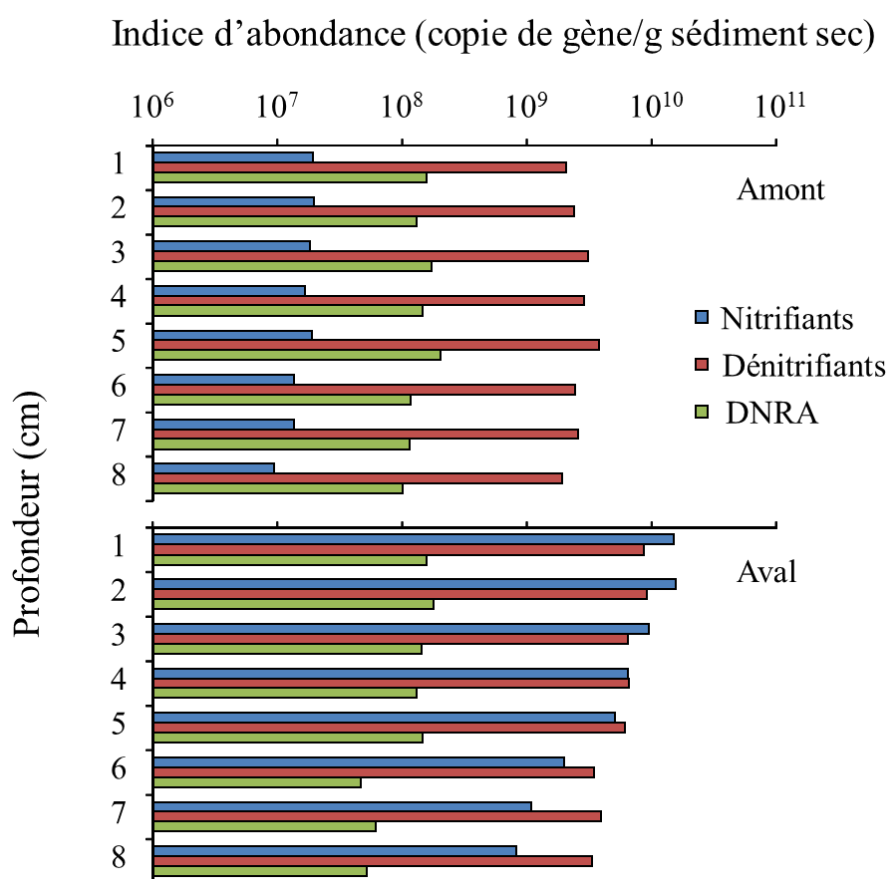


Figure 22 - Abondance des gènes marqueurs des Procaryotes impliqués dans la dynamique du nitrite (copies de gène par g de sédiment sec) dans le sédiment en amont et en aval de la STEP SAV. Les abondances des groupes impliqués dans la dynamique du nitrite sont représentées en fonction de la profondeur dans les carottes.

En aval, les dénitrifiantes sont également stable en profondeur, mais et l'indice d'abondance est plus élevés qu'en amont (Figure 22). Les abondances (en nombre de copies/g sédiment sec) des gènes indicateurs des nitrifiantes sont en revanche bien plus élevés à l'aval qu'à l'amont, probablement en lien avec les apports par la station SAV, tandis que les DNRA ne montrent pas de différences entre l'amont et l'aval. Ces indicateurs d'abondances restent tout de même similaires à ceux mentionnés ci-dessus par Wang et al. (2013) dans un milieu eutrophe, riche en matière organique comme c'est le cas de la Seine en aval des rejets de SAV, mais aussi à l'amont de SAV, après la traversée de l'agglomération parisienne. La forte abondance des nitrifiantes en surface en aval coïncidant avec la forte concentration de nitrite pourrait impliquer que ce groupe joue un rôle important dans la dynamique du nitrite. Les nombreux facteurs qui provoquent une accumulation de nitrite par nitrification sont en effet présents en aval de la STEP de fortes quantités de matière organique (Garcia-Robledo et al., 2013, Kelso et al., 1999) et de fortes concentrations en ammonium (Ruiz et al., 2003). Il est toutefois possible que l'apport simultané de nitrifiantes et de substrat azoté ne conduise pas à de réelles modifications de la dynamique du nitrite. Plusieurs études montrent en effet une corrélation entre l'augmentation de l'abondance des nitrifiantes du genre *Nitrospira* et l'augmentation des concentrations en ammonium (Altmann et al., 2004, Drury et al., 2013) alors même que l'ammonium est connu pour inhiber l'oxydation du nitrite (Ruiz et al., 2003). La présence de *Nitrospira* dans le sédiment en aval de la STEP SAV est probablement liée aux rejets de la STEP (Cébron et Garnier, 2005, cette thèse partie 3.C), mais la présence importante de l'indicateur d'abondance de ce genre bactérien en profondeur dans le sédiment pourrait indiquer, comme l'ont aussi observé Altman et al. (2004), une meilleure résistance de *Nitrospira* que *Nitrobacter* aux conditions sédimentaires (fortes concentrations d'ammonium et anoxie). Une telle résistance peut révéler une capacité à adopter un fonctionnement mixotrophe et des mécanismes de défense face aux stress oxydatifs (Lucker et al., 2010, Okabe et al., 1999). Le genre *Nitrobacter* est d'ailleurs également connu pour une capacité à adopter un fonctionnement mixotrophe (Winkler et al., 2012).

En conclusion, il apparaît que le sédiment de la Seine puisse être, à certaines périodes, une source de nitrite pour la colonne d'eau. Les incubations de carottes de sédiments montrent une production de nitrite qui n'est que très partiellement explicable par de la diffusion de nitrite depuis la profondeur. Cette production peut donc être expliquée par la nitrification du flux d'ammonium en provenance du sédiment, en présence d'oxygène dans l'eau surnageante et dans les premiers millimètres de sédiment, en présence de nombreuses bactéries nitrifiantes

dans les sédiments. Dans les carottes prélevées à l'amont de la STEP toutefois, la comparaison des profils de nitrite, d'ammonium et de nitrate suggèrent qu'il est possible qu'un processus anammox se développe quelques centimètres sous la surface en conditions anoxiques; le flux de nitrates vers le sédiment est clairement l'expression de sa réduction.

L'eutrophisation et l'augmentation de la matière organique qui lui est liée est un facteur souvent relié à une accumulation de nitrite dans l'environnement (Kelso et al., 1999, Garcia-Robledo et al., 2013, Wang et al., 2013, Gardner and McCarthy, 2009). La matière organique, qu'elle soit d'origine autochtone (phytoplancton) ou allochtone (rejets d'eau usée) est probablement en cause dans les deux sites de la Seine en amont et aval de SAV, perturbant ainsi les différentes voies du cycle de l'azote.

Pour confirmer les résultats obtenus dans cette étude du sédiment de la Seine, plusieurs axes pourraient être développés. Tout d'abord, une étude des taux de nitrification, dénitrification, DNRA et anammox permettrait de hiérarchiser les mécanismes dominant le cycle de l'azote en amont et en aval de la STEP. Alternativement, l'activité de ces Procaryotes pourrait également être étudiée au moyen de la Reverse Transcriptase-qPCR (RT-qPCR) qui permet d'appréhender l'expression des gènes étudiés. Cette technique permettrait d'obtenir un indicateur de l'activité des organismes étudiés et de déterminer plus précisément les communautés responsables de la production de nitrite dans le sédiment. L'utilisation d'une découpe plus fine des carottes, permettrait d'avoir une meilleure résolution, qui serait surtout utile à l'interface eau/sédiment pour déterminer le rôle des processus de nitrification/dénitrification/DNRA sur les flux de nitrite entre le sédiment et la colonne d'eau.

Le deuxième axe d'étude serait d'étendre géographiquement l'échantillonnage, afin d'augmenter la représentativité des résultats et mesurer la distance à laquelle la STEP influence l'environnement. Cet objectif serait accompli par la diversification des points de prélèvements de sédiment pour un même tronçon de la Seine. Il est en effet possible que la structure différente des sédiments prélevés en amont et en aval ait une influence sur les résultats obtenus. Un dernier axe serait d'étudier les variations saisonnières des flux d'azote à l'interface eau-sédiment ainsi que les concentrations d'azote et la quantité des Procaryotes (indicateurs) dans les sédiments. Cela permettrait de savoir si les observations faites pour octobre 2013 sont dues à conditions particulières ou si elles sont représentatives de saisons différentes.

### 3 Rôle de la colonne d'eau dans la dynamique du nitrite dans la Seine

Il a été montré dans le chapitre précédent que le sédiment peut être une source de nitrite pour la colonne d'eau de la Seine, mais également un puits dans le chapitre suivant. Ces flux sont faibles par rapport aux concentrations de nitrite observées dans la colonne d'eau, ce qui indique que le sédiment participerait peu à l'élimination de cet intermédiaire toxique du cycle de l'azote. L'étude de la colonne d'eau de la Seine a donc pour but de déterminer les raisons de la persistance du nitrite dans la Seine, plusieurs dizaines de km en aval de Paris. La cinétique de nitrification sera le premier aspect étudié, et permet de déterminer le rôle de la nitrification dans la dynamique du nitrite en Seine. L'abondance des communautés nitrifiantes ainsi que ses variations permettra de déterminer la répartition des nitrifiantes, entre celles oxydant l'ammonium et le nitrite. La diversité des communautés microbiennes de la Seine permettra aussi de connaître l'impact de Paris sur la composition des communautés microbiennes de la Seine. Le croisement de ces résultats permettra enfin de formuler une hypothèse sur le rôle des communautés nitrifiantes de la colonne d'eau concernant la dynamique du nitrite.

L'impact des STEPs de l'agglomération parisienne est au total un facteur important, qui doit pouvoir être estimé par les travaux de cette thèse.



A.      Cinétique de la nitrification et persistance du nitrite  
dans la Seine

---





# **Nitrifying kinetics and the persistence of nitrite in the Seine River, France**

*M. Raimonet<sup>1,\*</sup>, T. Cazier<sup>1</sup>, V. Rocher<sup>2</sup>, A.M. Laverman<sup>1,3,4</sup>*

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7619 METIS, F-75005 Paris, France

<sup>2</sup> SIAAP-Direction du Développement et de la Prospective, 82 avenue Kléber, 92700 Colombes, France

<sup>3</sup> Université de Rennes 1, UMR 6553 Ecobio, F-35042 Rennes, France

<sup>4</sup> CNRS, UMR 6553 Ecobio, F-35042 Rennes, France

\* Corresponding author: melanie.raimonet@gmail.com

Keywords: nitrite; nitrification; ammonia oxidizer; nitrite oxidizer; kinetics; river; WWTP

*Water Resource Research*, in prep

**ABSTRACT:** This study investigates kinetics of natural riverine and Waste Water Treatment Plant (WWTP)-related communities of ammonia and nitrite oxidizers. Although higher nitrite than ammonia oxidation rates generally avoids nitrite accumulation in oxic waters, nitrite concentrations in the Seine River exceed European norms. To get more insight in the role of pelagic nitrification in the origin and persistence of elevated nitrite concentrations downstream of Paris, we recalculated *in situ* rates of ammonia and nitrite oxidation from kinetics determined in the laboratory. The main source of nitrite is the major Parisian waste water treatment plant (WWTP), whereas its persistence kilometres downstream of the Plant is explained to a large extent by similar rates of pelagic ammonia and nitrite oxidation. Maximal ammonia oxidation rates are higher downstream of the WWTP, indicating significant inputs of ammonia oxidizers from the WWTP. In river and WWTP samples, nitrite oxidizers were unable to completely oxidize all available nitrite, possibly due to mixotrophic activity. This study highlights the low resilience of the Seine River to nitrite contamination, as well as the importance of managing nitrite, nitrifiers and organic matter concentrations in WWTP effluents in order to avoid or reduce nitrite persistence in rivers.

## I. Introduction

The occurrence of nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) accumulation is a major environmental issue, as  $\text{NO}_2^-$  is highly toxic to living organisms, even at low concentrations. Because of its toxicity, the European Water Framework Directive (EU WFD) quality criteria currently set the maximum  $\text{NO}_2^-$  concentration at 0.01-0.03 mg N- $\text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$  for fresh waters needing protection or improvement in order to support fish life (*i.e.* 0.7-2.1  $\mu\text{M}$ ; (European-Council-Directive, 2006), and 0.5 mg N- $\text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$  for drinking waters (*i.e.* 10  $\mu\text{M}$ ; . The presence of  $\text{NO}_2^-$  has been reported in both terrestrial and aquatic systems (Morris et al., 1985, Von der Wiese and Wetzel, 1998, Smith et al., 1997b). In all these ecosystems,  $\text{NO}_2^-$  concentrations were well above values generally found in non-polluted streams ( $0.003 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1} = 0.2 \mu\text{M NO}_2^-$  ; (Meybeck, 1982)), and even exceeded the EU WFD criteria of good environmental status ( $0.01 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1} = 0.7 \mu\text{M NO}_2^-$ ).

High  $\text{NO}_2^-$  concentrations in rivers are related to external and/or internal sources. External sources are generally tributaries and drainage basins, especially those characterized by intensive agricultural activities (Corriveau et al., 2010), and WWTP effluents (Rocher et al., 2011). Internal sources are due to the fact that  $\text{NO}_2^-$  is an intermediate species involved in both aerobic and anaerobic transformations. In oxic environments,  $\text{NO}_2^-$  is produced by ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) oxidation and then oxidized to nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) during nitrification. In hypoxic and anoxic environments,  $\text{NO}_2^-$  is involved in anaerobic reactions, *i.e.* denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) and anaerobic oxidation of ammonium (anammox).

Considering the complexity of the nitrogen cycle, the persistence of  $\text{NO}_2^-$  in the environment, *e.g.* in riverine waters, depends on the balance of production and consumption rates. The persistence of  $\text{NO}_2^-$  can be caused by an imbalance between ammonia and nitrite oxidation rates, spatial uncoupling of ammonia and nitrite oxidizers, or of ammonia oxidizers and denitrifiers, inhibition of the nitrite oxidation step, incomplete denitrification pathway, uncoupling of the activity of the four different enzymes involved in denitrification, or ammonia starvation recovery (Wilderer et al., 1987, Tappe et al., 1999, Philips et al., 2002, Park and Bae, 2009, Kelso et al., 1997, Smith et al., 1997b). The balance between nitrite production and consumption is strongly controlled by environmental variables, *e.g.* organic matter,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$  concentrations, bacterial biomass, activity and diversity (Kelso et al., 1997, Philips et al., 2002, Barak et al., 1998, Glass and Silverstein, 1998, Ruiz et al.,

2003, Webster et al., 2005, Kim et al., 2006). Nitrification rates can be disrupted by slight changes in many environmental variables including pH, dissolved oxygen, temperature, salinity, light, and sulfide concentration among others (Joye and Hollibaugh, 1995; Strauss and Dodds, 1997; Rysgaard et al., 1999; Nicol et al., 2008), which can lead to nitrite accumulation.

In oxic rivers, anaerobic reactions are mostly confined to the anoxic layer of the sediment. Nitrification and benthic fluxes at the sediment-water interface are thus expected to be the main processes involved in nitrite accumulation in oxic river waters (Helder and Devries, 1983, Morris et al., 1985, Kelso et al., 1997, Raimonet et al., 2015). In this study, we chose to focus on the role of pelagic nitrification in nitrite persistence. Even though ammonia oxidation is generally considered to be the rate limiting step during nitrification as  $\text{NO}_2^-$  is rarely detectable in the environment (Kowalchuk and Stephen, 2001), the occurrence of  $\text{NO}_2^-$  in oxic waters suggests that nitrite oxidation might be the limiting step under certain conditions, especially when ammonia and nitrite oxidation processes are imbalanced (Smith et al., 1997b, Philips et al., 2002).

In the Seine River downstream of the Parisian agglomeration,  $\text{NO}_2^-$  concentrations are often above the good EU WFD quality criteria (Rocher et al., 2011, Garnier et al., 2006). A large part of the  $\text{NO}_2^-$  is brought into the Seine River by the main “Seine Aval” (SAV) WWTP which receives water effluents from one of the most heavily populated systems in Europe, downstream of Paris (> 5 million population equivalent). Since the implementation of nitrification units in the SAV WWTP in 2007, and later denitrification units,  $\text{NH}_4^+$  concentrations strongly decreased in the Seine River (Rocher et al., 2011). On the contrary,  $\text{NO}_2^-$  concentrations are still high, and high  $\text{NO}_2^-$  levels persist over more than 100 kilometers downstream of Paris.

One hypothesis to explain  $\text{NO}_2^-$  persistence could be an imbalance between ammonia and nitrite oxidation rates during nitrification. Quantifying  $\text{NO}_2^-$  accumulation is possible by subtracting *in situ* ammonia and nitrite oxidation rates, both recalculated from the kinetics of natural assemblages of ammonia and nitrite oxidizers (*i.e.* potential rates, affinity) and temperature function (Hansen et al., 1981). Potential rates of natural communities of ammonia and nitrite oxidizers have been extensively studied in the Seine River (Brion et al., 2000, Cébron et al., 2003). Affinity of ammonia and nitrite oxidizers was studied for bacterial cultures or WWTP sludge (Hunik et al., 1992, Hunik et al., 1993, Brion and Billen, 1998, Jimenez et al., 2011), but rarely for natural microbial communities (Knowles et al., 1965).

Furthermore, the evolution of kinetic parameters of natural microbial communities along a river, at different seasons, and with environmental parameters (*e.g.* temperature) has not been studied in aquatic systems, and gives information on spatio-temporal changes of nitrifying community activity.

In this study, we investigated the role of pelagic nitrification in the origin and the persistence of nitrite in the Seine River. Ammonia and nitrite oxidation rates of the natural microbial communities were determined for increasing substrate concentrations ( $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_2^-$ ), (1) upstream and downstream the main Parisian WWTP, (2) in the WWTP effluent, (3) at different seasons, and (4) at various temperatures. We show how recalculated *in situ* nitrification rates explain to a large extent the persistence of nitrite in the Seine River downstream of Paris. The intensity of spatial and temporal variations of kinetic parameters relative to WWTP effluents and its implication for water quality management are discussed.

## II. Methodology

### II.1. Study site

Our study was carried out in the Seine River as well as in the main Parisian WWTP effluent located around Paris (Figure 23). The drainage basin of the Seine River, and especially the Parisian basin, is characterized by intense human activities, such as urbanization and agriculture, thus leading to nutrient-enriched waters, especially nitrate and nitrite (Garnier et al., 2006, 2007). More details on the study site are given in the Supporting Information.

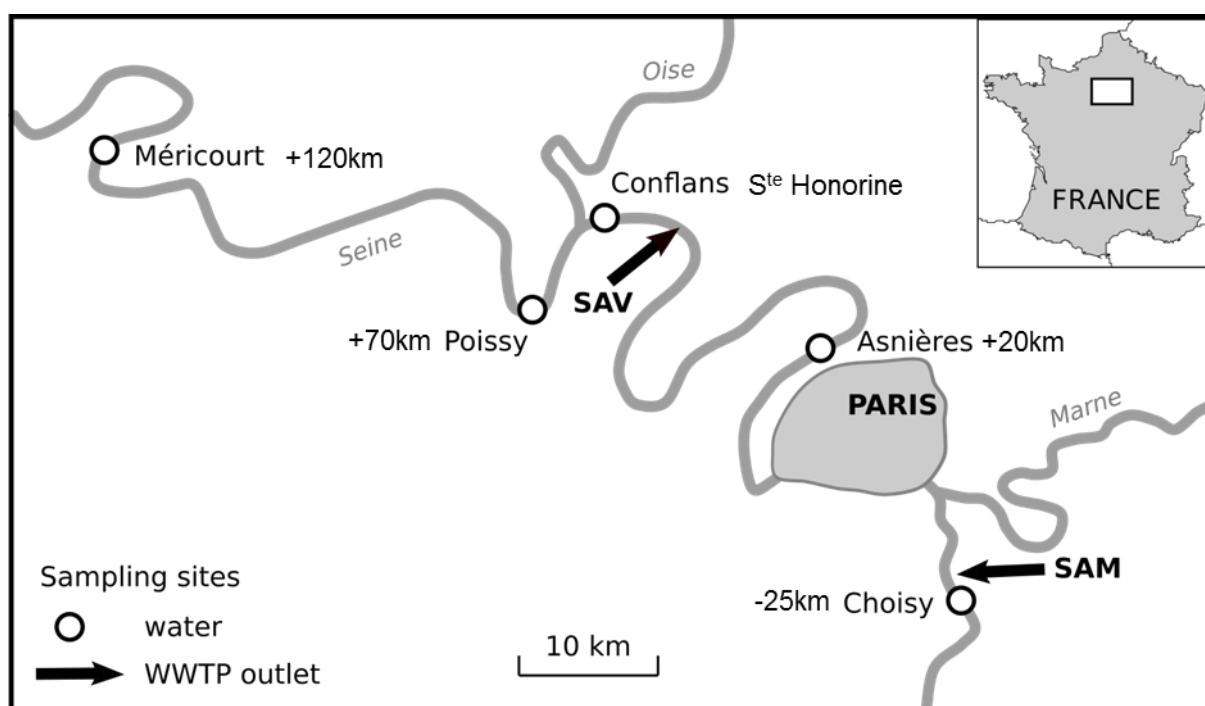


Figure 23 - Map of the Seine River system around Paris. Paris is taken as the reference station (km 0). All distances to the other stations are relative to Paris-Austerlitz

### II.2. Sampling design

Water samples (2 to 20 L) from the Seine River and WWTP effluents were collected monthly from March 2012 to February 2013. Samples were collected in 2 L or 10 L plastic bottles. Sampling was carried out at five stations along the Seine River (Choisy, Asnières, Poissy, Conflans S<sup>te</sup> Honorine, Méricourt) from upstream to downstream of Paris city, and at

two WWTP effluents, *i.e.* “Seine Amont” (SAM WWTP) and “Seine Aval” (SAV WWTP) (Figure 23). Note that the station Conflans/Seine was sampled in July 2012. An additional volume of 10-20 L was collected for batch experiments and measurements of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation rates, (1) at upstream and downstream of SAV WWTP, *i.e.* at Asnières and Poissy, in April and November 2012 and May 2013, (2) in the SAV WWTP effluent in November 2012 and May 2013, and (3) along the river at Choisy, Asnières, Poissy and Méricourt in May 2013. Samples were stored at 4°C in dark within 1 day until filtration, conditioning and/or batch experiments.

Water samples were filtered over 0.2  $\mu\text{m}$  PolyVinylidene Fluoride filters (PVDF, Millipore, Germany) and then either (1) immediately analyzed for  $\text{NO}_2^-$  concentrations, (2) stored in flasks at -20°C for analyses of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations, or (2) acidified with sulfuric acid and stored at 4°C for dissolved organic carbon concentrations (DOC). A known volume of water was filtered on 0.45  $\mu\text{m}$  GF-F glass fiber filters to measure suspended particulate matter concentrations (SPM).

### II.3. Measurement of ammonia and nitrite oxidation rates

Unfiltered water samples (200-250 mL) were incubated in Erlenmeyers of 500 mL in the dark at 20°C under constant agitation (120 rpm) for 22h. According to Cébron and Garnier (2005), two selective inhibitors, *i.e.* sodium chlorate (10 mM) and allylthiourea (0.1 mM), were used to study ammonia and nitrite oxidation rates, respectively. Aliquots were regularly sampled 3 or 4 times over 22h immediately filtered on 0.2  $\mu\text{m}$  PVDF filters and analyzed for  $\text{NO}_2^-$  concentrations. Both rates were determined from the increase or decrease of  $\text{NO}_2^-$  concentrations over 22h, *i.e.* when rates are linear (Cébron, 2004). Control samples were incubated with the two inhibitors at the same time in order to determine the net production or consumption of  $\text{NO}_2^-$ . To ensure the complete inhibition of nitrite oxidation, experiments with allylthiourea 0.1 and 1 M were performed for samples from Poissy in April 2013.

The effect of temperature on kinetic parameters was tested for one site in May 2013. We choose Poissy, just downstream the SAV WWTP, expecting highest nitrite production and consumption rates. Water samples were simultaneously incubated at +10, +20 and +30°C in order to investigate the influence of temperature on ammonia and nitrite oxidation kinetics.



This range is based on the temperature range observed in the Seine River (5-26°C) and the temperature increase expected with climate change.

Incubations were conducted in triplicate at different  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations, between 1 and 1000  $\mu\text{M}$ , to study kinetics of ammonia and nitrite oxidizers, respectively. The first concentration was the initial  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  content of the waters, substrate was added to achieve ~20, 50, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  when possible. Note that initial contents were close to 200 $\mu\text{M}$  in SAV WWTP waters preventing to measure rates at concentrations < 200  $\mu\text{M}$  (Fig. 2) resulting in 4 tested concentrations, whereas the other sites were tested for 6 to 7 different concentrations. As nitrification reactions are enzymatic, the evolution of ammonia oxidation (nitrite production) and nitrite oxidation rates follow Michaelis-Menten kinetics depending on the substrate concentration ( $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_2^-$ ). Kinetics are described by the following equation:

$$R = R_{max} \frac{[DIN]}{[DIN] + K_M}$$

Where  $R$  is either the ammonia or nitrite oxidation rate,  $R_{max}$  is the maximum rate,  $[DIN]$  is the substrate concentration (either  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_2^-$ ),  $K_M$  is the affinity constant for  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_2^-$ .

The oxidation rates of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  were plotted against  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations, respectively, and kinetic parameters ( $R_{max}$  and  $K_M$ ) were determined following the statistical method described in section 2.5.

The *in situ* ammonia and nitrite oxidation rates were then recalculated from these kinetic parameters, *in situ*  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations and water temperature:

$$R_{in\ situ} = R_{max} \frac{[DIN]_{in\ situ}}{[DIN]_{in\ situ} + K_M} f(T_{in\ situ})$$

Where  $R_{in\ situ}$  is either the *in situ* ammonia or nitrite oxidation rate,  $R_{max}$  is the maximum rate,  $[DIN]_{in\ situ}$  is the *in situ* substrate concentration (either  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_2^-$ ),  $K_M$  is the affinity constant for  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_2^-$ ,  $f(T_{in\ situ})$  is the temperature function defined by Brion and Billen (1998).

## II.4. Laboratory analyses

The concentrations of  $\text{NO}_2^-$  were determined using the spectrophotometric method of Rodier (1984). The method was adapted for microplate analysis which allowed reducing the sample (0.3 ml) as well as reactant volumes, optimizing simultaneous analyses.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations were measured by Ion Chromatography Dionex 300. The analytical precision was at least 5%. DOC concentrations were measured with O-I Analytical Aurora model 1030. SPM concentrations were determined by weighing the glass fiber filter before and after the filtration of a known volume of water. Daily  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations in SAM and SAV WWTP effluents were measured at the laboratory COFRAC of the “Direction du Développement et de la Prospective of the Syndicat Interdépartemental de l’Agglomération Parisienne” (Rocher et al., 2011).

## II.5. Statistics

All statistical analyses were performed with R software (<http://cran.r-project.org/>). Kinetic parameters ( $R_{max}$  and  $K_M$ ) were estimated by the non-linear least-square method. The standard error and the coefficient of variation ( $\text{CV} = \text{standard error}/\text{estimated parameter} \times 100$ ) were calculated for each parameter. Non-parametric Mann-Whitney tests were used to compare spatial and temporal variations of nutrient concentrations and adjusted values of kinetic parameters ( $R_{max}$  and  $K_M$ ).

### III. Results

#### III.1. Environmental variables along the Seine River

The  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations along the Seine River are presented in Figure 24.  $\text{NO}_3^-$  concentrations were high (300-500  $\mu\text{M}$ ) and showed little variation along the river downstream of Paris.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations were 1 to 2 orders of magnitude lower than  $\text{NO}_3^-$  concentrations.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations significantly increased after the SAV WWTP effluent in the Seine River (Mann-Whitney test  $W=36$   $p<0.01$  for  $\text{NH}_4^+$ ;  $W=22$   $p<0.001$  for  $\text{NO}_2^-$ ). Mean  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations decrease after the confluence with the major Oise affluent (between 70 and 80 km downstream of Paris).  $\text{NH}_4^+$  concentrations significantly decrease between 80 and 120 km downstream of Paris (Mann-Whitney test  $W=36$   $p<0.01$ ), but  $\text{NO}_2^-$  concentrations do not show any significant decrease (Mann-Whitney test  $W=83.5$   $p=0.52$ ).  $\text{NO}_2^-$  concentrations generally persisted over kilometres at concentrations exceeding the good environmental status European criteria.

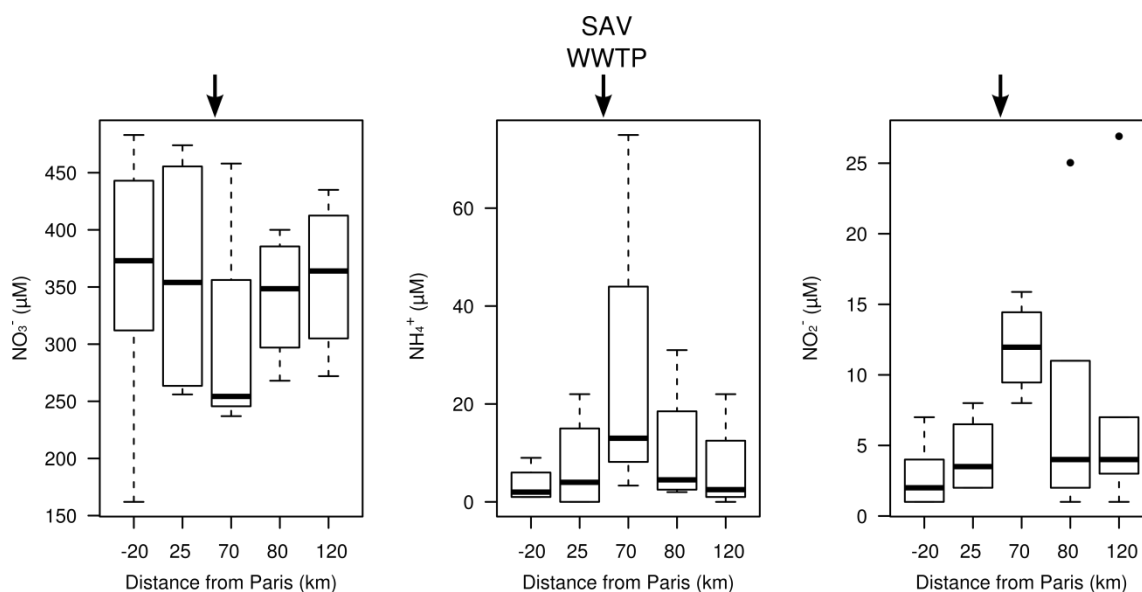


Figure 24 - Nitrate, nitrite and ammonium concentrations in the water column from Choisy-le-Roy to Méricourt along the Seine River (averaged values from monthly sampling from February 2012 to February 2013). Arrows indicate the SAV WWTP effluent.

The SAV WWTP effluent was characterized by high  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations ( $534 \pm 379$ ,  $301 \pm 211$  and  $152 \pm 58$   $\mu\text{M}$ ) compared to natural riverine samples. High  $\text{NH}_4^+$  concentrations and standard deviation in the SAV WWTP were mainly linked to periods of WWTP maintenance in 2012 (*i.e.* releases of higher  $\text{NH}_4^+$  enriched

effluents). In contrast, the SAM WWTP effluent showed high  $\text{NO}_3^-$  concentrations ( $5064 \pm 845 \mu\text{M}$ ) but constantly low  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations ( $34 \pm 45 \mu\text{M}$  and  $31 \pm 52 \mu\text{M}$ ).

### III.2. Nitrification kinetics

The absence of differences between nitrite oxidation rates measured with 0.1 or 1 M allylthiourea ensured the efficiency of allylthiourea at 0.1 M in completely inhibiting nitrite oxidation by bacteria and archaea in the Seine River, as already shown by Oishi et al. (2012).

In order to deduce kinetic parameters, the ammonium and nitrite oxidation rates were represented as a function of initial  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations for each station and season. An example of the adjustment of kinetic parameters ( $R_{max}$  and  $K_M$ ) is given in Figure 25. An overview of the adjusted kinetic parameters, throughout the different sampling dates and sites, is given in Table 2.  $R_{max}$  and  $K_M$  values were always higher for nitrite oxidizers than ammonia oxidizers regardless of station and season (Mann-Whitney test  $V=0$   $p<0.005$ ;  $V=0$   $p<0.005$ ). Kinetic parameters associated to ammonia oxidation varied upstream and downstream of the SAV WWTP effluent. The  $R_{max}$  values for ammonia oxidation were lower upstream (Asnières) than downstream (Poissy) ( $0.06 \pm 0.03$  versus  $0.14 \pm 0.08 \mu\text{M h}^{-1}$ ), however this difference was not significant (Mann-Whitney test  $V=0$   $p=0.25$ ). The  $K_M$  values for ammonia oxidation were similar for the two sites (Mann-Whitney test  $V=3$   $p=1$ ). For nitrite oxidation, the  $R_{max}$  and  $K_M$  were in the same range of values at Poissy and Asnières ( $5.03 \pm 2$  versus  $3.80 \pm 1.08 \mu\text{M h}^{-1}$ ;  $311 \pm 226$  versus  $355 \pm 234 \mu\text{M}$ ) and not significantly different (Mann-Whitney test  $V=6$   $p=0.25$ ;  $V=0$   $p=0.25$ ).

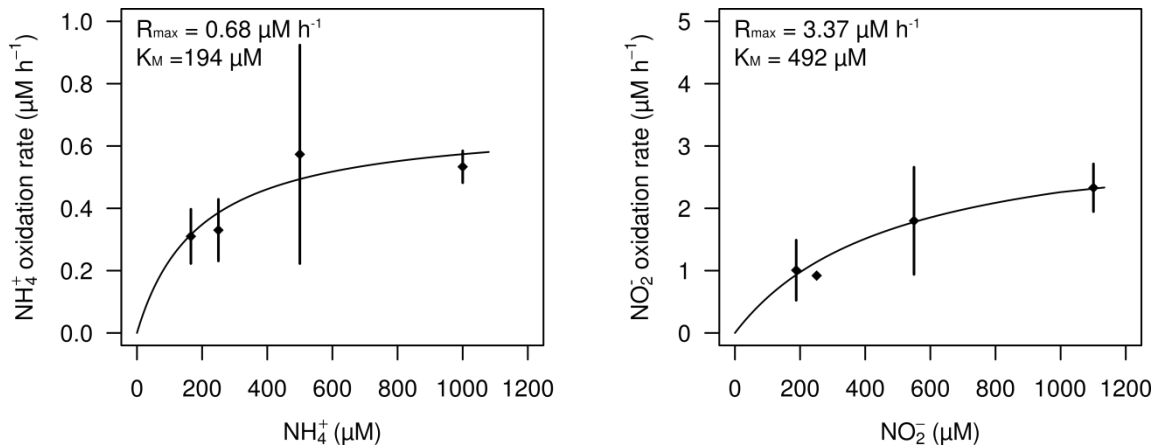


Figure 25 - Example of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation rates as a function of added  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  in the SAV WWTP effluent batch experiments in November 2012. Kinetic parameters ( $R_{\max}$  and  $K_M$ ) adjusted with the least-square method are indicated in each plot. The grey dashed lines indicates  $R_{\max}/2$  in y-axis and  $K_M$  in x-axis. The minimal  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations tested in the batch experiment are the initial concentration in the water sample.

Table 2 - Environmental variables in the water column, kinetic parameters ( $R_{\max}$  and  $K_M$ ) and in situ rates of ammonia and nitrite oxidizers determined from batch experiments for surface water collected upstream, downstream and in the effluent of the SAV WWTP, in April, November 2012 and May 2013. The last column ( $\text{NO}_2^-$  accum.) is the accumulation of nitrite: positive for a source, negative for a sink. \* coefficient of variation (CV) < 50%; † CV  $\in$  [50-100%]; ‡ CV > 100%. SPM: suspended particulate sediment; DOC: dissolved organic carbon.

Station	Date	Environmental variables						NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> oxidation			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> oxidation			
		T	pH	SPM	DOC	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	R <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>	R <sub>residu</sub>	R <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>	R <sub>residu</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> accum.
		(°C)		(mg l <sup>-1</sup> )	(mg l <sup>-1</sup> )	(μM)	(μM)	(μM h <sup>-1</sup> )	(μM)	(μM h <sup>-1</sup> )	(μM h <sup>-1</sup> )	(μM)	(μM h <sup>-1</sup> )	(μM h <sup>-1</sup> )
Upstream	Apr 2012	13	8.1	6	2.4	14	1	0.10 <sup>†</sup>	50 <sup>†</sup>	0.013	5.1 <sup>†</sup>	210 <sup>†</sup>	0.011	0.002
(Asnières)	nov-12	10	7.97	34	3.9	5	1.8	0.04 <sup>*</sup>	50 <sup>*</sup>	0.001	3.0 <sup>†</sup>	570 <sup>†</sup>	0.003	-0.001
	May 2013	13	8.2	19	4.4	4	1	0.04 <sup>*</sup>	50 <sup>*</sup>	0.002	7 <sup>*</sup>	152 <sup>†</sup>	0.021	-0.019
	mean									0.005			0.011	-0.006
	SD									0.007			0.009	0.011
Downstream	Apr 2012	13	7.99	9	3.5	30	11	0.23 <sup>*</sup>	43 <sup>†</sup>	0.057	3.5 <sup>†</sup>	244 <sup>†</sup>	0.068	-0.011
(Poissy)	nov-12	10	7.96	20	3.6	20	4	0.12 <sup>*</sup>	131 <sup>†</sup>	0.006	2.9 <sup>†</sup>	624 <sup>†</sup>	0.006	0.001
	May 2013	13	-	18	4.0	11	6	0.08 <sup>*</sup>	10 <sup>†</sup>	0.025	5 <sup>*</sup>	198 <sup>†</sup>	0.066	-0.041
	mean									0.029			0.047	-0.017
	SD									0.025			0.036	0.022
SAV WWTP	Apr 2012	13	7.98	16	15.1	261	98	-	-	-	-	-	-	-
effluent	nov-12	10	7.74	9	13.4	165	185	0.68 <sup>*</sup>	194 <sup>†</sup>	0.125	3.4 <sup>*</sup>	492 <sup>†</sup>	0.279	-0.154
	May 2013	13	-	8	15.6	103	54	1.4 <sup>*</sup>	30 <sup>†</sup>	0.651	6.5 <sup>†</sup>	621 <sup>†</sup>	0.234	0.417
	mean									0.125			0.279	-0.154
	SD									-			-	-

These spatial differences were also studied along a 150-km longitudinal transect between Choisy and Méricourt in May 2013 (Figure 26). The  $R_{\max}$  values for ammonia oxidation increased continuously from the upper to lower river sites (from 0.03 to 0.18  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) and were lower compared to nitrite oxidation.  $R_{\max}$  values for nitrite oxidation and  $K_M$  for both ammonia and nitrite oxidizers did not show significant trends (see details on the coefficients of variation below).

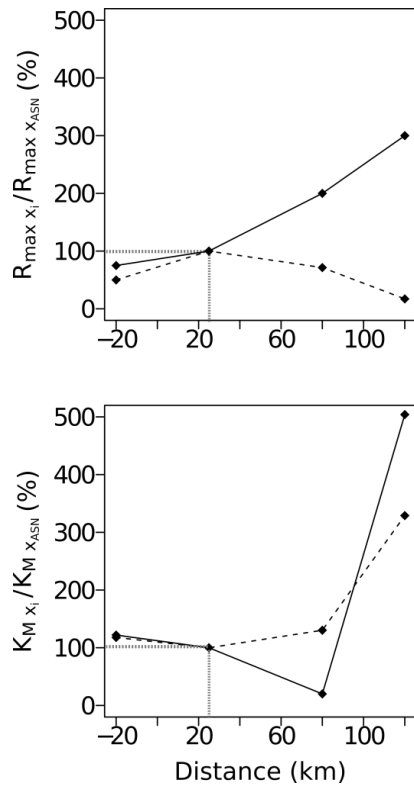


Figure 26 -  $R_{max}$  and  $K_M$  efficiency (%) as a function of temperature for  $NH_4^+$  and  $NO_2^-$  oxidation in batch experiments at Poissy in May 2013. The efficiency is the ratio of the value at the temperature  $T_i$  divided by the value at 20°C.

The seasonal variations of  $R_{max}$  and  $K_M$  are shown in Table 2. At both sites,  $R_{max}$  values for ammonia oxidation were lower in November 2012 and May 2013 compared to April 2012, but no trend was observed for  $K_M$  values. The highest  $R_{max}$  values for nitrite oxidizers were observed in spring (April 2012, May 2013) and the lowest in autumn (November 2012). On the contrary, the highest  $K_M$  values were observed in autumn and the lowest in spring.

The effect of temperature on  $R_{max}$  and  $K_M$  values is shown in Figure 27. The ratios  $R_{maxTi} / R_{maxT20^\circ C}$  and  $K_{MTi} / K_{MT20^\circ C}$  are shown in Figure 27 and the average trends of  $R_{max}$  and  $K_M$  values are described below. The  $R_{max}$  values for ammonia oxidation increased with temperature (from 0.03 to 0.18  $\mu M h^{-1}$ ), while  $K_M$  values were stable (10-13  $\mu M$ ).  $R_{max}$  values for nitrite oxidation increased from +10 to +20°C and were similar at +20 and +30°C (from 1 to 4.7-5  $\mu M h^{-1}$ ).  $K_M$  values for nitrite oxidation linearly increased from 73 to 317  $\mu M$  from +10 to +30°C.

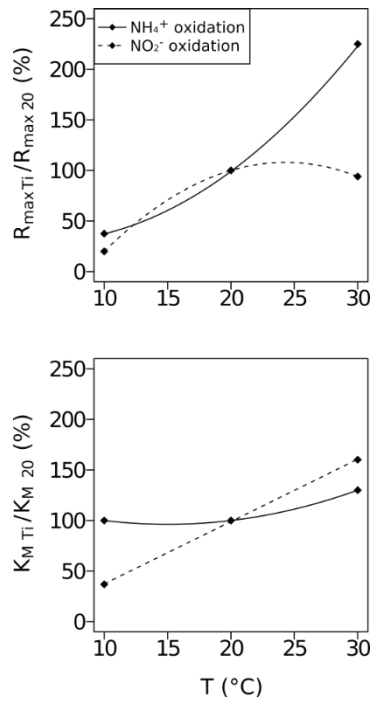


Figure 27 -  $R_{max}$  and  $K_M$  efficiency (%) as a function of temperature for  $NH_4^+$  and  $NO_2^-$  oxidation at Poissy in May 2013. The efficiency is the ratio of the value at the temperature  $T_i$  divided by the value at the temperature at  $20^\circ C$

The coefficients of variation (CV) of the two kinetic parameters were compared for spatial and seasonal scales (not shown). The similarity between CV values indicated that spatial and temporal variations were in the same range. CV values were generally high (> 30%) which indicated the high variability of  $R_{max}$  and  $K_M$  in space and time. The highest CV for triplicate measurements were found for  $K_M$  values of the nitrite oxidation step (>50 or 100%) which did not enable us to describe a significant pattern for this parameter. High CV is commonly found for  $K_M$  values of nitrite oxidizers even in pure culture (CV ~ 42%; Brion and Billen, 1998). CV values were usually high because of the presence of one sample different from the two others, as well as the small number of values (from a statistical point of view) during the fitting procedure ( $n \leq 12$ ).

For ammonia oxidation,  $R_{max}$  values in the SAV WWTP effluent exceeded those in natural river waters, while  $K_M$  were in the same range of values (Table 2). For nitrite oxidation,  $R_{max}$  and  $K_M$  values in the SAV WWTP effluent were in the range of natural river values. The  $R_{max}$  values in the SAV WWTP effluent were higher in May 2013 than in November 2012.

### III.3. *In situ* rates of nitrite production and consumption

While  $R_{max}$  values were higher for nitrite oxidation than ammonia oxidation at all stations and seasons,  $K_M$  values were higher, and *in situ*  $\text{NO}_2^-$  concentrations were always lower than  $\text{NH}_4^+$  concentrations (Table 2). Consequently, the resulting *in situ* rates of ammonia and nitrite oxidation were generally similar (Figure 28). Recalculated *in situ* nitrite oxidation rates were only higher than ammonia oxidation rates in May 2013. Regardless of the season, *in situ* ammonia and nitrite oxidation rates were higher downstream than upstream of the SAV WWTP, where  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations were always high. Similarly to  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations and temperature, *in situ* ammonia and nitrite oxidation rates were higher in spring (April 2012, May 2013) than in autumn (November 2012). We compared *in situ* rates for ammonia and nitrite oxidation determined with (1) the mathematical equations described in Polus et al. (2011) based on data obtained by Brion and Billen (1998) (Figure 28) and with the (2) the mathematical equations obtained in this study (not shown) based on 3 different temperatures (see Figure 27). *In situ* rates for ammonia and nitrite oxidation were slightly higher when using our mathematical equations (by a factor 0.1 to 2), but showed the same spatial and temporal trends regardless of the equation used.

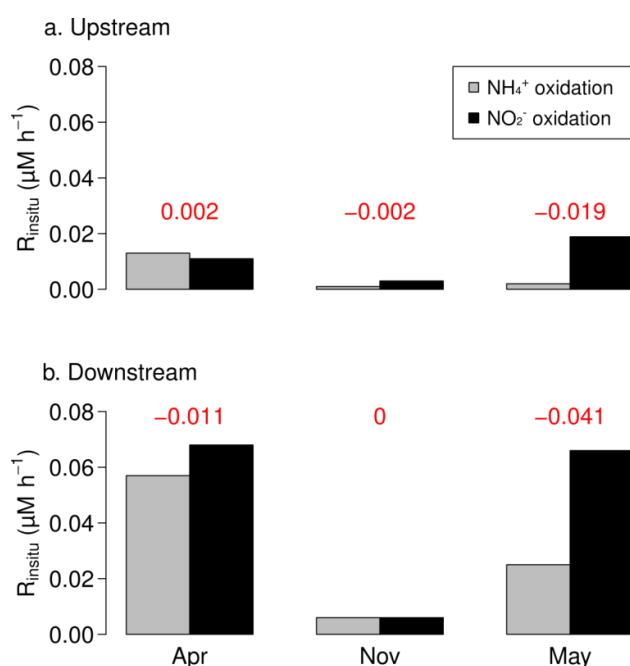


Figure 28 - *In situ* rates of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation (a) upstream and (b) downstream the SAV WWTP (at Asnières and Poissy) in April, November 2012 and May 2013. The net nitrite flux (production-consumption) is indicated for each case



### III.4. Seasonal budgets

Seasonal N budgets are presented in Figure 29. High  $\text{NO}_3^-$  fluxes originated from Seine, Marne and Oise drainage basins. These fluxes were one to two orders of magnitude higher than  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  fluxes. High  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  fluxes were released by the SAV WWTP, two to six times higher than upstream riverine fluxes. Ammonia and nitrite oxidation fluxes related to microbial processes were one order of magnitude higher downstream than upstream the WWTP. These fluxes were however low compared to external  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  fluxes from the upper drainage basin and the SAV WWTP. Benthic nitrogen fluxes calculated by Raimonet et al. (2015) were also added to the budget.

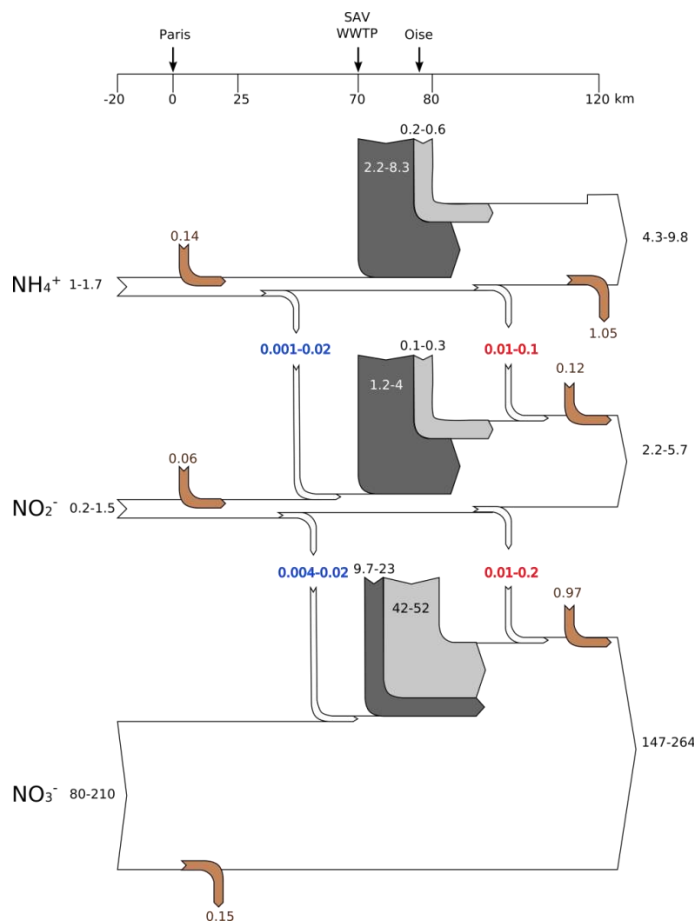


Figure 29 - Dissolved inorganic nitrogen flows ( $\text{T N d}^{-1}$ ) from -20 km (Choisy) to 120 km (Méricourt) from Paris for the campaigns in spring and autumn 2012-13 (minimum and maximum flows observed in April, November 2012 and May 2013). Nitrifying  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation fluxes are indicated upstream (blue) and downstream (red) the WWTP. Fluxes from SAV WWTP and Oise River are indicated by dark and light grey arrows, respectively. Benthic nitrogen fluxes determined by Raimonet, Vilmin et al. (2015) are indicated by brown arrows. The main WWTP influence being SAV, the other WWTP (e.g. SAM and SEC) are ignored in this figure.

## IV. Discussion

### IV.1. Anthropogenic sources of nitrite

The nitrite concentrations observed in the Seine River (1-31  $\mu\text{M}$ ) are significantly higher than those observed in non-polluted systems (estimated at 0.1  $\mu\text{M}$ ; (Meybeck, 1982). The increase of high nitrite concentrations downstream of the SAV WWTP effluent (Fig. 1) indicates that the SAV WWTP effluent is the main source of nitrite (*i.e.* external source). Such high concentrations have already been observed in other systems *e.g.* the Ems-Dollard Estuary (0.1-14.5  $\mu\text{M}$ ; (Helder and Devries, 1983), the Lahn River (21  $\mu\text{M}$ ; (Von der Wiese and Wetzel, 1998), the Tamar Estuary (1.6-2.5  $\mu\text{M}$ ; (Morris et al., 1985). In the latter studies, the hypothetical source of nitrite was benthic nitrite releases, nitrite oxidation rates lower than ammonia oxidation rates, or nitrite oxidizer activity limitation by low oxygen concentrations or by critical temperature (*i.e.* internal source).

The nitrite flux from the SAV WWTP is up to one order of magnitude higher than the upper riverine nitrite flux (Table 2). Nitrite concentrations often exceed the EU WFD criteria of good environmental status of 6.5  $\mu\text{M}$  downstream the SAV WWTP (4-31  $\mu\text{M}$ ). These high concentrations are linked to the partial nitrification-denitrification tertiary treatment added in the SAV WWTP in 2007. This implementation efficiently decreased ammonium concentrations in the WWTP effluent, as well as in the downstream riverine water (Rocher et al., 2011). Yet, nitrite concentrations increased in the SAV WWTP effluent and Seine water due to incomplete denitrification (Rocher et al., 2011).

The presence of nitrite upstream of Paris ( $\geq 1 \mu\text{M}$ ) indicates that nitrite also originates from the drainage basin, whereas higher concentrations observed in March, August and September 2012 (4-8  $\mu\text{M}$ ) suggest seasonal fluctuations of this input. Upstream nitrite may originate from imbalanced nitrification (Morris et al., 1985) or incomplete anaerobic nitrate reduction (denitrification or DNRA; (Kelso et al., 1997) in benthic sediments, as already observed in Seine sediments (Garnier et al., 2010, Laverman et al., 2010), as well as terrestrial loads from intensive agricultural lands (Corriveau et al., 2010, Shen et al., 2003). In order to manage river water quality it is important to identify the main sources of nitrite, both external and internal. In the Seine River the main nitrite flux is via the SAV WWTP.

## IV.2. Persistence of nitrite in riverine waters

We investigated whether internal sources of nitrite related to nitrification processes in the water column could explain nitrite persistence in the oxic riverine water of the Seine. The persistence of elevated nitrite concentrations over kilometres after their release from WWTP to the river can be explained to a large extent by the oxidation rates for the different nitrification steps. The low or non-existent elimination of nitrite from the Seine River is partly due to similar *in situ* nitrite production and consumption rates *in situ*. The  $R_{max}$  values (*i.e.* potential rates) for ammonia oxidizers were always lower than those of nitrite oxidizers (Table 2), which is in agreement with values found for other natural estuarine communities (Knowles et al., 1965). The few studies that investigated ammonia and nitrite oxidation kinetics in pure cultures (*e.g.* Brion and Billen, 1998) showed that, even if  $R_{max}$  is lower for nitrite oxidation, the affinity for nitrite is high (low  $K_M$ ), leading to a rapid consumption of nitrite without accumulation (Kowalchuk and Stephen, 2001, Brion and Billen, 1998). Using river water and the natural nitrifying communities, we showed that  $R_{max}$  values were higher for nitrite oxidizers than for ammonia oxidizers, however high  $K_M$  values led to similar *in situ* rates and fluxes for the two processes (Figure 28 and Figure 29).

The kinetic parameters of the environmental nitrite oxidizing communities exhibited relative low affinity for nitrite (high  $K_M$  values) albeit within the range of values previously determined (Table 3). Our results and the high range of variability observed in the literature suggest that these parameters differ depending on ecosystems and are potentially involved in the persistence of nitrite. Nitrite accumulation has already been explained by a higher inhibition of *Nitrobacter* activity compared to *Nitrosomonas* at a critical temperature range of 16-22 °C in the Lahn River (Von der Wiese and Wetzel, 1998), which can only explain part of the persistence in our system (*in situ* temperature 10-13 °C).  $R_{max} / K_M$  ratios (a proxy of oxidation efficiency) of nitrite oxidizers were generally higher than those of ammonia oxidizers, but similar at 30°C. This suggests that nitrification might be more likely limited by nitrite oxidizer activity at high temperature.

Table 3 - Synthesis of kinetic parameters of ammonia- and nitrite-oxidizers. a Cébron (Cébron, 2004); b (Knowles et al., 1965) ; c (Helder and Devries, 1983) ; d (Hanaki et al., 1990) ; e (Focht et al., 1977); f (Martens-Habbena et al., 2009); g (Hunik et al., 1992); h (Brion and Billen, 1998); i (Hunik et al., 1993); j (Schramm et al., 1999); k (Laudelout and Vantichelen, 1960); l (Blackburne et al., 2007) ; m (Wagner et al., 2002)

Community	System	$R_{max}$ ( $\mu\text{M h}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	References
Ammonia oxidizers				
River	Seine	0.02-0.4	<b>43-132</b>	a, this study
Estuary	Seine	0.21-1.15	-	a
	Thames	-	14-571	b
	Ems-Dollars	-	55	c
WWTP	SAV (Paris)	0.1-3.7	<b>30-194</b>	a,d, this study
River & WWTP		-	70-700	e
Oligotrophic	culture	0.857	0.134	f
<i>N. europaea</i>	culture	8.6	5-107	g,h
Nitrite oxidizers				
River	Seine	<b>0-5.1</b>	<b>210-624</b>	a, this study
Estuary	Seine	0.07-0.57	-	a
	Thames	-	12-571	b
	Ems-Dollars	-	267	c
WWTP	SAV (Paris)	<b>0-6.5</b>	<b>25-621</b>	a,d, this study
River & WWTP		-	350-600	e
<i>Nitrobacter sp.</i>	culture	1.61	1.7-1380	h,i,j,k,l
<i>Nitrospira sp.</i>	culture	-	oct-79	l,m

Depending on the season, net nitrite production is positive or negative and close to zero (see Figure 28). These variations may lead to seasonal differences in nitrite persistence. Nevertheless, *in situ* nitrification rates are low compared to the WWTP nitrite flux Figure 28 and unlikely to allow a significant decrease of ammonium and nitrite concentrations in the river. Significant decreases of nitrite concentrations should occur in the water column considering similar  $R_{max}$  values and an affinity for nitrite as those obtained for nitrite oxidizers in pure cultures of *Nitrobacter winogradskyi* ( $K_M = 1.7 \mu\text{M}$ ; (Brion and Billen, 1998) However, nitrite persists in the Seine River, most likely due to a low affinity for nitrite. The discrepancy between the  $K_M$  values obtained in our study and those by Brion and Billen

(1998) is most likely due to the fact that the latter was obtained for enrichments of pure culture under ideal conditions (use of synthetic medium). The values obtained in the current study represent a range of those of the nitrite oxidizing community and conditions present in the Seine River (river water *versus* synthetic medium), consequently predicting the nitrite persistence.

In addition to the low and similar ammonium and nitrite oxidation rates, the persistence of nitrite is favoured by the high river discharge which does not allow significant changes of nitrite concentrations during water transport. Under these conditions, the highest decrease in nitrite concentrations is due to dilution of river waters by nitrite-poor tributaries (*e.g.* 10-20% decrease after the confluence with the Oise River; this study) and not to in-stream nitrification processes in the water column. Benthic nitrification and nitrate reduction might still contribute to the nitrite flux (Helder and Devries, 1983, Morris et al., 1985, Kelso et al., 1997). Hydro-ecological modelling in the same river section showed indeed that benthic nitrification leads to a nitrite flux to the water column (Raimonet et al., 2015).

#### IV.3. Nitrification kinetics of riverine microbial communities

In the present study, kinetic parameters ( $R_{max}$  and  $K_M$ ) for ammonia and nitrite oxidizers were determined for natural communities growing in river waters, whereas these parameters are usually investigated for pure cultures or WWTP sludge under optimal conditions.

The  $R_{max}$  values of ammonia oxidation obtained in our study (0.04-0.23  $\mu\text{M h}^{-1}$ ) are similar to those already measured along the Seine River and Estuary prior to 2007 (0-0.3  $\mu\text{M h}^{-1}$ ; (Cébron et al., 2003). The  $K_M$  values for ammonia oxidation (10-132  $\mu\text{M}$ ) are also in the range of values found in the literature (5-700  $\mu\text{M}$ ; Table 4) and especially close to the values found for *Nitrosomonas europaea*, one of the most widespread ammonia oxidizers. The highest  $R_{max}$  values for ammonia oxidation observed downstream of the WWTP (Table 2) indicate a higher microbial activity of ammonia oxidizers compared to upstream, most likely due to ammonium and microbial biomass releases by the WWTP (Table 2; (Servais et al., 1999, Brion et al., 2000, Cébron et al., 2003, Garnier et al., 1992).

The  $R_{max}$  and  $K_M$  values for nitrite oxidation in the Seine River are relatively high, as expected at relative high substrate concentrations (i.e. r-strategists; Kim and Kim, 2006). These values resemble those of pure cultures of *Nitrobacter winogradskyi* (Brion and Billen, 1998) and the  $R_{max}$  is an order of magnitude higher than determined in the Seine River prior to 2007 (Cébron et al., 2003). Even though nitrite concentrations in the Seine River exceed the European norm, they are low for microbial activity and high substrate affinity (low  $K_M$  values) is required to oxidize all nitrite. The presence of *Nitrobacter sp.* has been demonstrated in the Seine River prior to 2007 (Cébron and Garnier, 2005), and appears still to be dominant in the river water. The low affinity for nitrite (high  $K_M$  values) of the nitrite oxidizers might be related to other factors than nitrite concentrations. The lack of nitrite utilization over the first 8 days in long term incubation (14 days; Raimonet, Vilmin et al., 2015) could suggest the use of carbon source instead of nitrite until carbon is exhausted. Nitrite oxidizers, in contrast to ammonia oxidizers, are known for their capacity to use organic carbon, in addition to nitrite (mixotrophic) or as a sole carbon source (heterotrophic). The presence of dissolved organic carbon (DOC, 2.4-4.4 mg L<sup>-1</sup>; Table 2) and particulate organic matter (SPM, 6-34 mg L<sup>-1</sup>; Table 2) may have favoured the development of mixotrophs in the Seine River. It has been shown that nitrite oxidation increased at high nitrite concentrations in the presence of yeast extract-peptone solution in pure cultures of *Nitrobacter agilis* (Steinmuller and Bock, 1976). Moreover, *Nitrobacter hamburgensis* exhibited high  $K_M$  values in the presence of acetate in nitrite-limited chemostats (Both et al., 1992) compared to low  $K_M$  when only nitrite was present. Overall, the high  $R_{max}$  and  $K_M$  values of the nitrite oxidizers suggest mixotrophic growth that could explain the lack of efficient nitrite oxidation at river nitrite concentrations. Additional information regarding the dominant nitrite oxidizers and its physiology would be required. Experiments using <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, DOC and nitrite amendment might shed a light on the possible mixotrophic activity.

High  $R_{max}$  values for the nitrite oxidation step were observed even upstream the SAV WWTP (Asnières and Choisy in May 2013; Figure 26) suggesting that mixotrophic nitrite oxidizers also originate from diffusive sources (e.g. cultivated soils, benthic sediments). The kinetics of nitrite oxidizers does not significantly change 100-km downstream the WWTP effluent, i.e. when nitrite concentrations are increased compared to upstream the WWTP. This can be explained by species competition - *Nitrobacter* could inhibit the growth of *Nitrospira* - and by time needed to change the structure of the community (Nogueira and Melo, 2006).

Variations in environmental variables and microbial communities might control seasonal variations of nitrification kinetic parameters. We found a relation between high  $R_{max}$  and low  $K_M$  with increasing pH and temperature. Higher pH (~8) has already been shown to be related to higher nitrite accumulation (Bae et al., 2001, Ruiz et al., 2003), which we relate to changes in nitrite oxidizer kinetics in our study (*i.e.* both increasing  $R_{max}$  and decreasing  $K_M$ ). Temperature-dependent  $R_{max}$  is consistent with microbial activity promoted by higher temperature. Our results confirm that ammonia and nitrite oxidizer kinetics are temperature-dependent (Schmidt et al., 2003). The highest  $R_{max}$  values observed at 20 and 30 °C (Figure 27) are in agreement with the bell curve generally obtained with optimal temperature ranging between 25 and 35 °C (Brion and Billen, 1998, Focht et al., 1977, Henriksen et al., 1988). The highest  $R_{max}$  values of nitrite oxidizers are explained by their similar or higher maximal oxidation and growth rates compared to ammonia oxidizers (Table 3; (Schmidt et al., 2003). The continuous increase of  $R_{max}$  values of ammonia oxidizers with temperature compared to the stabilization of  $R_{max}$  values of nitrite oxidizers above 20 °C (Figure 27) is consistent with the expected highest response of ammonia oxidizers to temperature-increase (Schmidt et al., 2003). The affinity of ammonia oxidizers for ammonium can also be influenced by increasing DOC and heterotrophs (Hanaki et al., 1990), and might be significantly modified in systems receiving enriched DOC and heterotroph point sources. We also found a slight increase of  $K_M$  values on the temperature for nitrite oxidizers, consistent with an increase of  $K_M$  values for a similar range of temperatures (8-23°C; (Knowles et al., 1965).

*Table 4 - Spearman statistical correlation test between kinetic parameters of nitrite oxidizers in Seine water ( $R_{max}$  and  $K_M$ ) with temperature (T) and pH*

Parameter	Variable	S	cor	p
$R_{max}$	T	6.02	0.83	<0.05
	pH	0	1	<0.05
$K_M$	T	64	0.83	<0.05
	pH	40	1	<0.05

#### IV.4. Implications for river water quality modelling and management

Our results confirm that WWTPs alter environmental variables of riverine waters (*e.g.* increase ammonia and nitrite concentrations) and constitute a source of nitrifiers.  $R_{max}$  of ammonia oxidizers particularly increase downstream the SAV WWTP effluent, suggesting an increase of biomass and activity. The input of nitrifier biomass (Even et al., 1998) and more recently ammonia and nitrite oxidizing biomass (Garnier et al., 2007) are taken into account in modelling studies in the Seine River, models that are used for prospective management studies. Point sources, taken into account nitrifier community biomass and kinetics (Raimonet et al., 2015), should be generalized in the modelling of aquatic systems receiving WWTP effluents or any significant source of nitrifier for water quality assessment.

Particular attention should be given to the duration of incubations, as well as the medium used to grow nitrifiers, to estimate kinetic parameters used in hydro-ecological models. Determining nitrite oxidation rates under ideal conditions (pure cultures, synthetic medium without organic carbon) might lead to estimations of kinetic parameters that are not representative for the *in situ* situation. Moreover, if mixotrophy occurs, mathematical equations should be changed in order to take into account the use of organic carbon during nitrification. This points out the importance of limiting anthropogenic organic matter loads to rivers, in order to avoid mixotrophy and nitrite persistence in rivers.

Our results also suggest that  $K_M$  of nitrite oxidizers can vary with the temperature, as already observed in the Thames estuary (Knowles et al., 1965), as well as with pH. However, if in-stream nitrifying communities change over seasons and are characterized by very contrasted  $K_M$  values, the temperature-dependency measured for one nitrifying assemblage could be not representative of the annual evolution of the  $K_M$ . This indicates that affinity changes induced by changes in community composition could overcome temperature-dependence.



## V. Conclusions

If we only consider total nitrogen, the addition of nitrification/denitrification in WWTPs efficiently improves water quality in terms of total nitrogen loads to the estuary and coastal zone. However when nitrite is considered, high concentrations can be observed downstream WWTPs, impacting the river water quality. The persistence of nitrite downstream the WWTP in the Seine River is explained by hydrological and ecological processes *i.e.* similar and low ammonia and nitrite oxidation rates compared to high river flow and benthic nitrite fluxes, as well as mixotrophy of nitrite oxidizers. Independently of processes involved in nitrite dynamics, the persistence of nitrite in riverine waters shows the sensitivity and low resilience of aquatic systems like the Seine River to anthropogenic activities *e.g.* WWTP effluents.

## ACKNOWLEDGMENTS

The study was funded by the Région Ile de France and the PIREN-Seine program. The authors thank Erwan Garcia-Gonzalez, Julien Pouillaude, Céline Briand, Sabrina Guérin from the Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP) for the monthly sampling of water; Laura Culoma, Laurence Millot-Cornette, Céline Roose-Amsaleg, Lauriane Vilmin, Arnaud Blanchouin, Adrienne Jonnet, Bruno Monteiro, Lucas Gandy for assistance in the laboratory, Anun Martinez, Benjamin Mercier, for laboratory analyses, Nicolas Escoffier for providing water temperature dataset at Bougival in 2012-13, Aurélien Baro for the study site map, and Josette Garnier for constructive comments on the paper. The data for this paper are available by contacting the corresponding author at [melanie.raimonet@upmc.fr](mailto:melanie.raimonet@upmc.fr).

## REFERENCES

- Bae, W., Baek, S., Chung, J., Lee, Y., 2001. Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation* 12, 359–366.
- Barak, Y., Tal, Y., Rijn, J. van, 1998. Light-Mediated Nitrite Accumulation during Denitrification by *Pseudomonas* sp. Strain JR12. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 813–817.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Keller, J., 2007. Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Research* 41, 3033–3042.
- Both, G.J., Gerards, S., Laanbroek, H.J., 1992. Kinetics of nitrite oxidation in two *Nitrobacter* species grown in nitrite-limited chemostats. *Arch. Microbiol.* 157, 436–441.
- Brion, N., Billen, G., 1998. Une réévaluation de la methode d'incorporation de H14C03- pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. *Revue des sciences de l'eau* 11, 283.
- Brion, N., Billen, G., Guézennec, L., Ficht, A., 2000. Distribution of nitrifying activity in the Seine River (France) from Paris to the estuary. *Estuaries and Coasts* 23, 669–682.
- Cébron, A., 2004. Nitrification, bactéries nitrifiantes et émissions de N<sub>2</sub>O. La Seine en aval de Paris. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 289 pp.
- Cébron, A., Berthe, T., Garnier, J., 2003. Nitrification and Nitrifying Bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7091–7100.
- Cébron, A., Coci, M., Garnier, J., Laanbroek, H.J., 2004. Denaturing Gradient Gel Electrophoretic Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Structure in the Lower Seine River: Impact of Paris Wastewater Effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6726–6737.
- Cébron, A., Garnier, J., 2005. *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research* 39, 4979–4992.
- Corriveau, Julie, Bochove, E. van, Savard, M.M., Cluis, D., Paradis, D., 2010. Occurrence of High In-Stream Nitrite Levels in a Temperate Region Agricultural Watershed. *Water Air Soil Pollut* 206, 335–347.
- Even, S., Poulin, M., Garnier, J., Billen, G., Servais, P., Chesterikoff, A., Coste, M., 1998. River ecosystem modelling: Application of the PROSE model to the Seine river

(France), in: Amiard, J.-C., Rouzic, B.L., Berthet, B., Bertru, G. (Eds.), *Oceans, Rivers and Lakes: Energy and Substance Transfers at Interfaces, Developments in Hydrobiology*. Springer Netherlands, pp. 27–45.

European Council Directive, 1998. Directive 1998/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Union, 23 p.

European Council Directive, 2006. Directive 2006/44/EC of the European parliament and of the council of 6 September 2006 on the quality of fresh waters needing protection or improvement in order to support fish life. Official Journal of the European Union, 12 p.

Focht, D.D., Verstraete, W., 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification [Soils]. *Advances in Microbial Ecology* 1, 135–214.

Garnier, J., Cébron, A., Tallec, G., Billen, G., Sebilo, M., Martinez, A., 2006. Nitrogen behaviour and nitrous oxide emission in the tidal Seine River estuary (France) as influenced by human activities in the upstream watershed. *Biogeochemistry* 77, 305–326.

Garnier, J., Billen, G., Cébron, A., 2007. Modelling nitrogen transformations in the lower Seine river and estuary (France): impact of wastewater release on oxygenation and N<sub>2</sub>O emission. *Hydrobiologia* 588(1), 291–302.

Garnier, J.A., Mounier, E.M., Laverman, A.M., Billen, G.F., 2010. Potential Denitrification and Nitrous Oxide Production in the Sediments of the Seine River Drainage Network (France). *Journal of Environmental Quality* 39, 449–459.

Glass, C., Silverstein, J., 1998. Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research* 32, 831–839.

Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S., 1990. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Water research* 24(3), 289–296.

Helder, W., De Vries, R.T.P., 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (Ems-Dollard estuary). *Netherlands Journal of Sea Research* 17, 1–18.

Henriksen, K., Kemp, W.M., 1988. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In: *Nitrogen cycling in coastal marine sediments*, T. H. Blackburn and J. Sørensen, pp 201–249.

Hunik, J.H., Meijer, H.J.G., Tramper, J., 1992. Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 37, 802–807.

Hunik, J.H., Meijer, H.J.G., Tramper, J., 1993. Kinetics of *Nitrobacter agilis* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 40, 442–448.

Jiménez, E., Giménez, J.B., Ruano, M.V., Ferrer, J., Serralta, J., 2011. Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate. *Bioresource Technology* 102, 8741–8747.

Joye, S.B., Hollibaugh, J.T., 1995. Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science* 270, 623–625.

Kelso, B., Smith, R.V., Laughlin, R.J., Lennox, S.D., 1997. Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4679–4685.

Kelso, B.H.L., Smith, R.V., Laughlin, R.J., 1999. Effects of Carbon Substrates on Nitrite Accumulation in Freshwater Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 61–66.

Kim, D.-J., Lee, D.-I., Keller, J., 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology* 97, 459–468.

Knowles, G., Downing, A.L., Barrett, M.J., 1965. Determination of Kinetic Constants for Nitrifying Bacteria in Mixed Culture, with the Aid of an Electronic Computer. *J Gen Microbiol* 38, 263–278.

Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., n.d. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual review of microbiology* 55, 485–529.

Laverman, A.M., Garnier, J.A., Mounier, E.M., Roose-Amsaleg, C.L., 2010. Nitrous oxide production kinetics during nitrate reduction in river sediments. *Water Research* 44, 1753–1764.

Laudelout, H., Van Tichelen, L., 1960. Kinetics of the nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradskyi*. *Bacteriologia* 79, 39–42.

Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre, J.R., Stahl, D.A., 2009. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* 461, 976–979.

Meybeck, M., 1982. Carbon, nitrogen, and phosphorus transport by world rivers. *Am J Sci* 282, 401–450.

Morris, A.W., Howland, R.J.M., Woodward, E.M.S., Bale, A.J., Mantoura, R.F.C., 1985. Nitrite and ammonia in the Tamar estuary. *Netherlands Journal of Sea Research* 19, 217–222.

Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I., 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* 10, 2966–2978.

Nogueira, R., Melo, L.F., 2006. Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 95, 169–175.

Oishi, R., Tada, C., Asano, R., Yamamoto, N., Suyama, Y., Nakai, Y., 2012. Growth of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Cattle Manure Compost under Various Temperatures and Ammonia Concentrations. *Microb Ecol* 63, 787–793.

Park, S., Bae, W., 2009. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochemistry* 44, 631–640.

Philips, S., Laanbroek, H.J., Verstraete, W., 2002. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1, 115–141.

Polus, E., Flipo, N., de Fouquet, C., Poulin, M., 2011. Geostatistics for assessing the efficiency of distributed physically-based water quality model. Application to nitrates in the Seine River. *Hydrol. Process.* 25 (2), 217e233.

Raimonet, M., Vilmin, L., Flipo, N., Rocher, V. and Laverman, A. M. (2015) 'Modelling the fate of nitrite in an urbanized river using experimentally obtained nitrifier growth parameters', *Water research*, 73, pp. 373-87.

Rocher, V., Garcia-Gonzalez, E., Paffoni, C., Thomas, W., 2011. La production de nitrites lors de la dénitrification des eaux usées: un sujet sensible et complexe ! *L' Eau, l'industrie, les nuisances* 80–83.

Rodier, J., 1984. *L'analyse de l'eau*, 8e éd. Paris, Bordas.

Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R., 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research* 37, 1371–1377.

Rysgaard, S., Thastum, P., Dalsgaard, T., Christensen, P.B., Sloth, N.P., 1999. Effects of salinity on  $\text{NH}_4$  + adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *Estuaries* 22, 21–30.

Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 481–492.

Schramm, A., de Beer, D., Heuvel, J.C. van den, Ottengraf, S., Amann, R., 1999. Microscale Distribution of Populations and Activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a Macroscale Gradient in a Nitrifying Bioreactor: Quantification by In Situ Hybridization and the Use of Microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3690–3696.

Servais, P., Garnier, J., Demarteau, N., Brion, N., Billen, G., 1999. Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. *Water Research* 33, 3521–3531.

Shen, Q., Ran, W., Cao, Z., 2003. Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification. *Chemosphere* 50, 747–753.

Smith, S.V., Doyle, R.M., Burns, L.C., Stevens, R.J., 1997. A model for nitrite accumulation in soils. *Soil Biology Biochemistry* 29(8), 1241–1247.

Strauss, E.A., Dodds, W.K., 1997. Influence of Protozoa and Nutrient Availability on Nitrification Rates in Subsurface Sediments. *Microb Ecol* 34, 155–165.

Tappe, W., Laverman, A., Bohland, M., Braster, M., Rittershaus, S., Groeneweg, J., Verseveld, V., W, H., 1999. Maintenance Energy Demand and Starvation Recovery Dynamics of *Nitrosomonas Europaea* and *Nitrobacter Winogradskyi* Cultivated in a Retentostat with Complete Biomass Retention. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2471–2477.

Von der Wiese, M., Wetzel, A., 1998. Temporal and spatial dynamics of nitrite accumulation in the River Lahn. *Water Research* 32, 1653–1661.

Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H., 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 665–680.

Webster, G., Embley, T.M., Freitag, T.E., Smith, Z., Prosser, J.I., 2005. Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environmental Microbiology* 7, 676–684.

Webster, G., Embley, T.M., Freitag, T.E., Smith, Z., Prosser, J.I., 2005. Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environmental Microbiology* 7, 676–684.

Wilderer, P.A., Jones, W.L., Dau, U., 1987. Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Research* 21, 239–245.

B.      Analyse de la diversité microbienne dans la colonne  
                 d'eau

---





## I. Introduction

La nitrification est une voie métabolique permettant de transformer l'ammonium en nitrate, en deux étapes, l'oxydation de l'ammonium en nitrite, puis en nitrate en présence d'oxygène. Ce processus est important dans l'environnement, et a lieu dans tous les milieux où ammonium et oxygène coexistent comme l'eau, le sédiment ou encore les sols (Prosser and Nicol, 2008, Herbert, 1999, Attiwill and Adams, 1993). Ce processus est également utilisé dans des stations d'épuration pour diminuer les rejets d'ammonium dans l'environnement (Rocher et al., 2012b, Rocher et al., 2012a). Ce processus biologique introduit en 2007 par le syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne (SIAAP) dans la station d'épuration (STEP) Seine Aval pour diminuer les rejets en ammonium dans la Seine a ainsi modifié la dynamique des différentes formes de l'azote en aval de Paris (Aissa-Grouz et al., 2015, Raimonet et al., 2015). Si les rejets en ammonium ont effectivement beaucoup diminué (de 60 à 10 tonnes  $\text{N-NH}_4^+$ /j), la STEP rejette désormais du nitrate (20 tonnes  $\text{N-NO}_3^-$ /j) accompagné par du nitrite dont les concentrations dépassent le critère de bon état écologique de l'eau (DCE à  $0,7 \mu\text{M}$ ). Dans la Seine en aval de la STEP Seine Aval (SAV), qui traite environ 70% des eaux usées parisiennes, les nitrites apportés, persistent sur plusieurs dizaines de kilomètres après SAV. Auparavant, les forts rejets d'ammonium impliquaient une nitrification en basse Seine et entraînaient une production continue de nitrite le long de la Seine jusqu'à atteindre des valeurs maximales en aval de la basse Seine et dans l'estuaire fluvial (Garnier et al., 2007). Le traitement par nitrification dans la STEP est suivi désormais par une dénitrification, mais le nitrite reste encore un élément déclassant de la qualité de l'eau de la Seine après SAV. Nous avons observé que ce niveau trop élevé en nitrite dans l'eau sur ce tronçon de quelques dizaines de km était probablement lié à un équilibre entre sa production par les Ammonium Oxydants (AO) et son élimination par les Nitrite Oxydants (NO) (Raimonet et al., In preparation).

De nombreuses études portent sur les populations bactériennes ammonium oxydantes (AOB) (Dionisi et al., 2003, Sonthiphand et al., 2013, Cébron et al., 2004) et nitrite oxydantes (NOB) (Huang et al., 2010, Jin et al., 2010, Cébron et Garnier, 2005) dans l'environnement et dans des STEP. Mais ces études portent rarement sur plusieurs saisons, malgré l'importance des facteurs de contrôle physicochimiques et hydrologiques. Les populations bactériennes et archéennes sont de plus, rarement étudiées en même temps. Les travaux de Cébron et al. (2004) ont porté sur la diversité des AOB et ont montré que la STEP Seine Aval était une source de populations bactériennes qui se maintenaient dans l'environnement, les AOB

rejetées par la STEP représentant alors 40 % de la diversité au niveau de l'estuaire. Le présent travail consiste à évaluer l'effet des changements de traitement dans la STEP en 2007 sur les communautés de Procaryotes (bactériennes et archéennes) de la colonne d'eau de la Seine. Pour cela, la diversité des communautés de Procaryotes (totales et oxydatrices de l'ammonium tant Bactéries qu'Archées) a été mesurée le long d'un tronçon de 160 km de long sur la Seine, de l'amont à aval de l'agglomération parisienne par la méthode d'empreintes moléculaires 'denaturing gradient gel eletrophoresis' (DGGE). Ces analyses poursuivent les mesures de cinétique de nitrification (chapitre 3A.) en investiguant les organismes nitrifiants et la structure de leurs communautés.

## II. Méthodologie

### II.1. Site d'étude

Le site d'étude est le même que pour l'étude de la cinétique de nitrification (chapitre 3A.) avec des sites de prélèvement supplémentaires. Les prélèvements d'eau de Seine ont été effectués par le service Direction Développement et Prospective (DDP) du Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP) entre mars 2012 et février 2013. Les échantillons d'eau de surface ont été prélevés au centre des cours d'eau depuis un pont, sur la Seine et la Marne (Figure 30). L'eau a été prélevée au seau, à trois reprises successives et homogénéisée afin d'obtenir un échantillon représentatif pour chaque site du cours de la Seine. En plus de ces sites environnementaux, les eaux de rejet SAV ont été fournies par la DDP. Ces échantillons représentent un mélange des eaux rejetées pendant 24 h par la STEP. Les échantillons environnementaux et les rejets de STEP sont conditionnés en glacière dans des bidons en plastique de 2 L avant d'être acheminés au laboratoire.

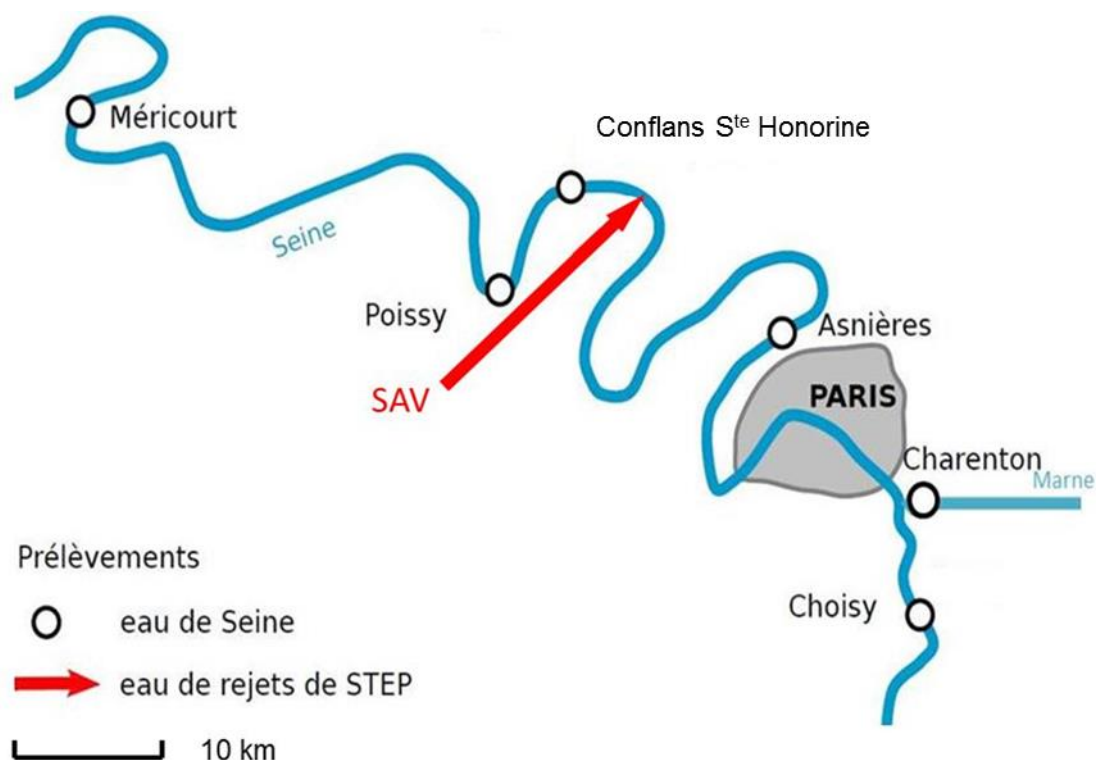


Figure 30 - Carte des sites de prélèvements d'eau le long de la Seine en Ile-de-France ainsi que des rejets de la station d'épuration Seine Aval.

## II.2. Extraction de l'ADN

Le protocole d'extraction ainsi que le conditionnement des ADN extraits a été le même que celui utilisé pour l'analyse des communautés microbiennes issues du sédiment (chapitre 2). Les biais induits sont donc les mêmes : perte des séquences rares et donc de diversité.

## II.3. Etude de la diversité

La première étape de l'analyse de diversité par « Denaturing Gradient Gel Electrophoresis » (DGGE) ou électrophorèse sur gel à gradient de dénaturant consiste en une amplification du gène d'intérêt dans l'échantillon à analyser. Pour l'analyse des Bactéries oxydant l'ammonium (AOB) ainsi que les Archées dans leur totalité, les PCR utilisées seront des PCR « nested », qui repose sur deux PCR successives (Tableau 5).

*Tableau 5 - Liste des amorces utilisées pour les DGGE*

Gène ciblé	Primer			Taille amplifia	Reference
16S Bactérien	F-357 GC	⌘CCTACGGGAGGCAGCAG	0,05 µM	161 pb	Muyzer et al., 1993
	R-518	ATTACCGCGGCTGCTGCTGG	0,05 µM		
16S Archeén	109F	ACKGCTCAGTAACACGT	0,2 µM	1383 pb	Grosskopf et al., 1998
	1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	0,2 µM		Lane et al., 1991
16S Archéen	771F	ACGGTGAGGGATGAAAGCT	0,2 µM	156 pb	Ochsenreiter et al., 2003
	927R	⌘CGGCGTGTACTCCAATTG	0,2 µM		Ochsenreiter et al., 2004
AOB <i>amoA</i>	<i>amoA</i> 1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	0,8 µM	491 pb	Rothauwe et al., 1997
	<i>AmoA</i> 2R	CCCCTCTGCAAAGCCTTCTTC	0,8 µM		
AOA <i>amoA</i>	A23F	ATGGTCTGGCTWAGACG	0,3 µM	629 pb	Sahan & Muyzer 2008
	A616R	GCCATCCATCTGTATGTCCA	0,3 µM		

⌘ Position de la pince GC

La DGGE (Cf. Chapitre 1.II.4) consiste à séparer des fragments préalablement amplifiés en PCR d'un même gène en fonction de leur pourcentage en bases G et C selon un gradient de dénaturants (formamide et urée) dans un gel de polyacrylamide. Un gradient de 40 à 70 % de dénaturants a été utilisé pour l'analyse des AOB, des Bactéries et des Archées, et un gradient de 15 à 55% pour l'analyse des AOA. Plus le pourcentage en G-C de la séquence à analyser est faible, plus la migration de fragment d'ADN est arrêtée par une faible concentration en dénaturants. L'arrêt de la migration d'un fragment d'ADN est dû à la séparation partielle des deux brins d'ADN ce qui en augmente l'encombrement. Le détail du protocole est donné en pages 32 à 35.

## **II.4. Tests statistiques**

Un test de normalité Shapiro-Wilk, puis un test Kruskal-Wallis est utilisé pour déterminer si les différences entre les différents échantillons d'un groupe (par ex. ceux de différents sites) sont significatives. Ces tests ont été effectués avec le logiciel SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA).

### III. Résultats

#### III.1. Conditions environnementales

Pour la période qui nous concerne, le débit de la Seine à Paris (Austerlitz) varie d'un minimum en fin d'été (septembre 2012) de  $80 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ , à un maximum en hiver (février 2013) de  $1100 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$  (Figure 31). La moyenne du débit pendant les 7 jours précédant et succédant aux prélèvements d'août et décembre sont respectivement de 106 et  $357 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ . Aux mêmes périodes, et pour le même intervalle encadrant la date des prélèvements, SAV a rejeté en moyenne 14 et  $23 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$  respectivement.

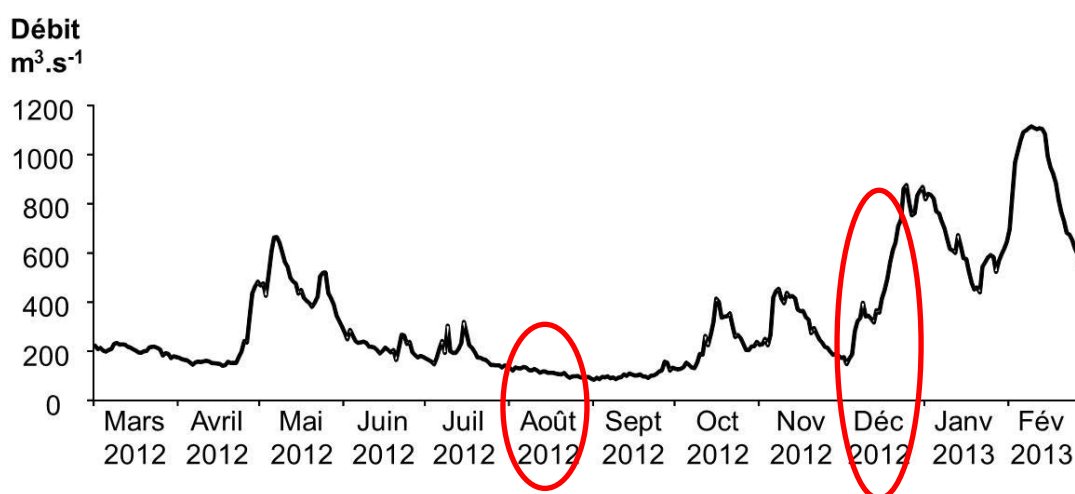


Figure 31 - Débit de la Seine à la station d'Austerlitz (Paris) pendant la période mars 2012-février 2013 (les cercles rouges indiquent les prélèvements étudiés en DGGE)

Les concentrations des formes de l'azote varient en sortie de SAV : le nitrite a été quantifié à 87 et  $278 \mu\text{M NO}_2^-$  et l'ammonium à 86 et  $239 \mu\text{M NH}_4^+$  en août et décembre respectivement (Tableau 6). Des concentrations en nitrite plus importantes sont ainsi mesurées dans la Seine en aval par rapport à l'amont (en août  $10,1 \mu\text{M NO}_2^-$  à Poissy pour  $1,2 \mu\text{M NO}_2^-$  à Asnières et en décembre  $21,7 \mu\text{M NO}_2^-$  à Poissy pour  $2,1 \mu\text{M NO}_2^-$  à Asnières, respectivement en aval et en amont, soit une augmentation d'un facteur 10 environ) (Tableau 6).

*Tableau 6 - Débits, concentrations en ammonium et nitrites dans la Seine à Asnières et Poissy ainsi que dans les rejets des STEP Seine Amont (SAM) et Seine Aval (SAV)*

	prélèvement	Débit m3/s	Ammonium μM	Nitrite μM
SAM	mars-12	4	1,7	2,1
	avr.-12	6	2,2	2,9
	mai-12	5	1,1	1,4
	juin-12	4	2,2	2,9
	juil.-12	4	3,9	5,0
	<b>août-12</b>	<b>3</b>	<b>15,0</b>	<b>19,3</b>
	sept.-12	6	17,2	22,1
	oct.-12	4	5,0	6,4
	nov.-12	4	7,2	9,3
	<b>déc.-12</b>	<b>4</b>	<b>5,0</b>	<b>6,4</b>
	janv.-13	6	18,6	2,9
	févr.-13	6	50,7	17,9
Asnières	mars-12	229	5,6	2,2
	avr.-12	150	5,6	2,0
	mai-12	399	8,9	5,7
	juin-12	220	4,4	6,5
	juil.-12	169	5,0	6,7
	<b>août-12</b>	<b>111</b>	<b>5,0</b>	<b>1,5</b>
	sept.-12	96	7,2	5,9
	oct.-12	367	17,8	7,4
	nov.-12	424	3,9	4,3
	<b>déc.-12</b>	<b>344</b>	<b>4,4</b>	<b>2,6</b>
	janv.-13	569	23,9	2,2
	févr.-13	621	3,3	1,1
SAV	mars-12	16	433,6	301,4
	avr.-12	26	728,6	115,7
	mai-12	19	172,1	130,0
	juin-12	21	252,9	130,0
	juil.-12	17	96,4	42,9
	<b>août-12</b>	<b>15</b>	<b>86,4</b>	<b>87,1</b>
	sept.-12	28	552,1	57,1
	oct.-12	21	216,4	374,3
	nov.-12	18	183,6	233,6
	<b>déc.-12</b>	<b>18</b>	<b>238,6</b>	<b>277,9</b>
	janv.-13	29	1 172,9	60,0
	févr.-13	21	453,6	175,0
Poissy	mars-12	373	48,3	10,4
	avr.-12	254	172,2	20,9
	mai-12	550	18,3	14,6
	juin-12	310	37,8	15,4
	juil.-12	306	13,9	11,3
	<b>août-12</b>	<b>194</b>	<b>8,9</b>	<b>10,0</b>
	sept.-12	146	17,8	12,6
	oct.-12	326	26,7	21,3
	nov.-12	537	12,8	8,3
	<b>déc.-12</b>	<b>330</b>	<b>31,7</b>	<b>21,7</b>
	janv.-13	741	36,7	10,9
	févr.-13	1 019	18,3	3,5



### **III.2. Variation temporelle de la diversité des Bactéries**

Dans ce paragraphe est présentée l'analyse de 4 sites : deux en Seine, Asnières et Poissy, ainsi que les effluents des deux stations d'épuration SAM et SAV suivis à la fréquence mensuelle pendant un an.

La richesse spécifique d'un échantillon est définie par le nombre d'unités taxonomiques opérationnelles (UTO) présentes dans cet échantillon telles qu'obtenues par DGGE (cf. Chapitre 1.II.4 Matériel et méthodes). Une communauté microbienne est un « assemblage multi-espèces, dans lequel les organismes vivent dans un environnement contigu et interagissent » (Konapka A. 2009). La structure d'une communauté est le concept qui combine la diversité de cette communauté et sa composition (Bell et al., 2005), alors que la diversité est le nombre d'espèces présent dans cet échantillon (Grattepanche et al., 2014), représenté par le nombre d'UTO dans le cas de la DGGE.

En comparant les 4 sites deux par deux pour la communauté bactérienne totale (une STEP et son site aval dans la Seine), il apparaît que la similarité des communautés bactériennes est plus forte entre les prélèvements d'un même site qu'entre les prélèvements effectués à une même date en différents sites (Figure 32). Le groupement n'est pas strictement lié au site dans la mesure où des profils obtenus en STEP et en rivière se groupent parfois ensemble.

Les sites ont donc été étudiés séparément afin d'avoir une indication sur l'évolution saisonnière de la communauté bactérienne totale (Figure 32). La richesse spécifique est relativement stable pour un site d'une date de prélèvement à l'autre, avec des variations cependant plus importantes pour les communautés de la Seine (35-55 UTO pour Asnières, 20-45 UTO pour Poissy) que dans les communautés rejetées par les STEP (40-55 UTO pour SAM, 30-40 UTO pour SAV) (Figure 32). En considérant les groupes de similarité basés sur la composition en UTO dans les quatre sites étudiés, aucun groupement clair ne peut être effectué. Ce résultat signifie que les compositions varient temporellement site par site.

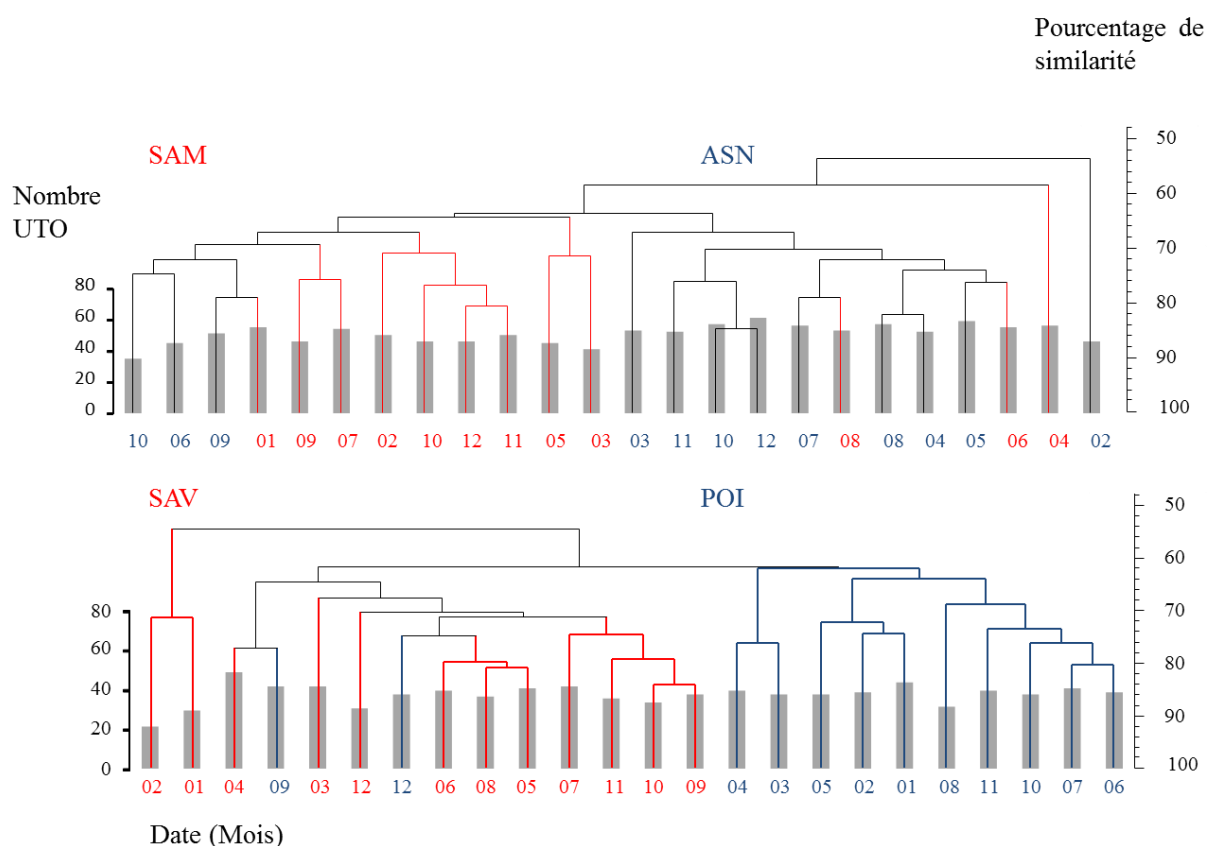


Figure 32 - Variation annuelle (mois indiqués en abscisse) de la diversité et de la richesse des Bactéries totales. Le nombre d'UTO est représenté sous forme de diagramme, avec l'échelle à gauche, et la similarité, calculée avec l'indice de Jaccard, sous forme de dendrogramme, avec l'échelle à droite. Comparaison des communautés issues de SAM et Asnières, et des communautés issues de SAV et Poissy. Les résultats obtenus pour les STEP sont identifiés par la couleur rouge, et les résultats obtenus pour la rivière par la couleur bleue.

### III.3. Variations spatiales de la diversité des Procaryotes

**Procaryotes totaux.** La richesse spécifique en Bactéries est similaire dans la rivière et dans les rejets de STEP (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ), en décembre et août (Figure 33). L'analyse de similarité montre qu'elle est élevée (78 et 65 %) entre les trois sites en aval de SAV en août et décembre (Figure 33). La richesse spécifique en Archées est plus importante dans la rivière (15 UTO) que dans les rejets de STEP (7 UTO) (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ) en août et décembre (Figure 32). Cette diversité est plus importante dans les rejets de SAM que dans les rejets de SAV. L'analyse de similarité ne montre pas de groupement des sites en aval de SAV. Les communautés de Procaryotes en STEP ont peu de similarité avec les communautés de la rivière. Cependant les communautés archéennes en sortie de SAM sont plus proches des communautés de la rivière (15 et 32 %) que celles issues de SAV (11 et 9 %) (Figure 33).

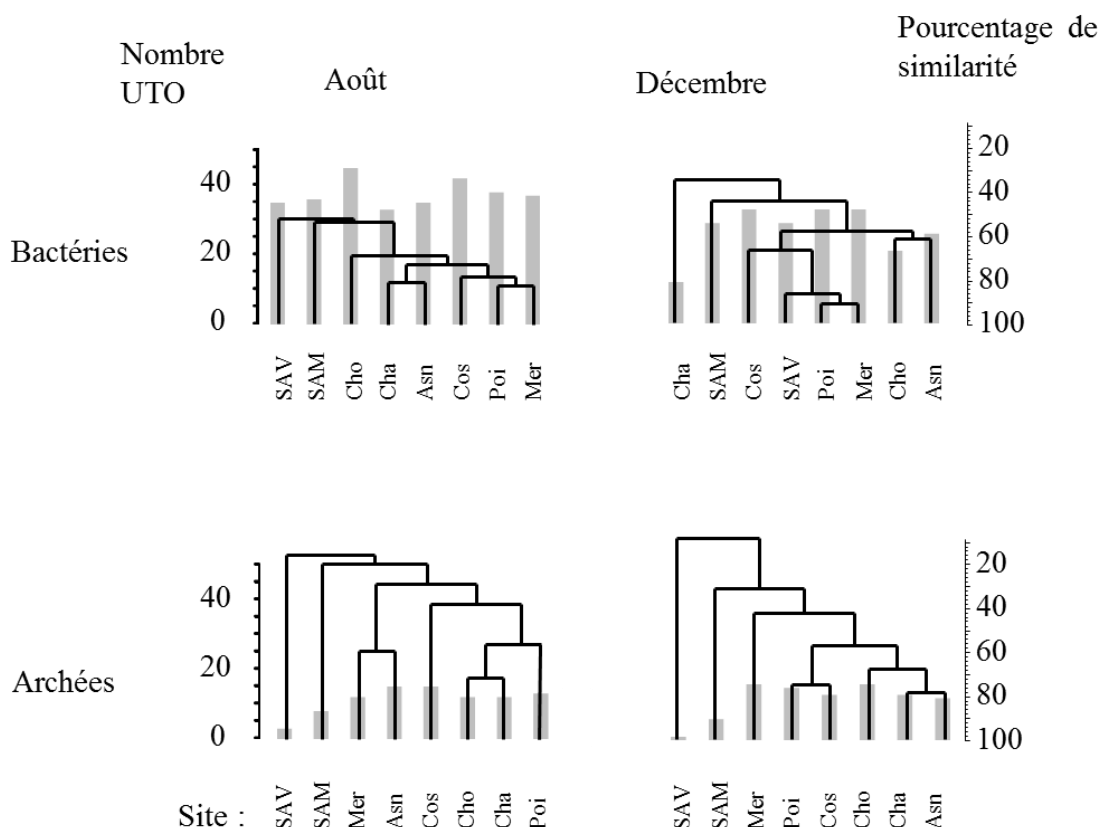


Figure 33 - Diversité des Procaryotes totaux, Bactéries et Archées en août et décembre. Le nombre d'UTO est représenté sous forme de diagramme, avec l'échelle à gauche, et la similarité sous forme de dendrogramme, avec l'échelle à droite.

**Communautés nitrifiantes (*ammonium oxydantes*).** La richesse des communautés AOB de l'environnement est significativement plus élevée en décembre qu'en août (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ). La richesse spécifique dans les rejets de SAV (13 en août et 19 en décembre) est similaire à celle de l'environnement (12 et 18 en moyenne) quelle que soit la saison (Figure 33). L'analyse de similarité montre un regroupement des sites en aval de SAV en décembre (78 %) et en août (65 %) (Figure 33). En décembre, la communauté issue de la STEP SAV est plus proche des sites en aval, faisant partie du groupe de similarité des sites Conflans, Poissy, Méricourt (65 %). La richesse des communautés AOA de l'environnement est similaire en août et décembre (Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ ) avec 13 UTO en moyenne. La richesse des communautés issues des STEP est plus faible que dans l'environnement, en août et décembre. L'analyse de similarité des communautés AOA de l'environnement ne montre pas de groupement clair entre l'amont et l'aval de la STEP SAV.

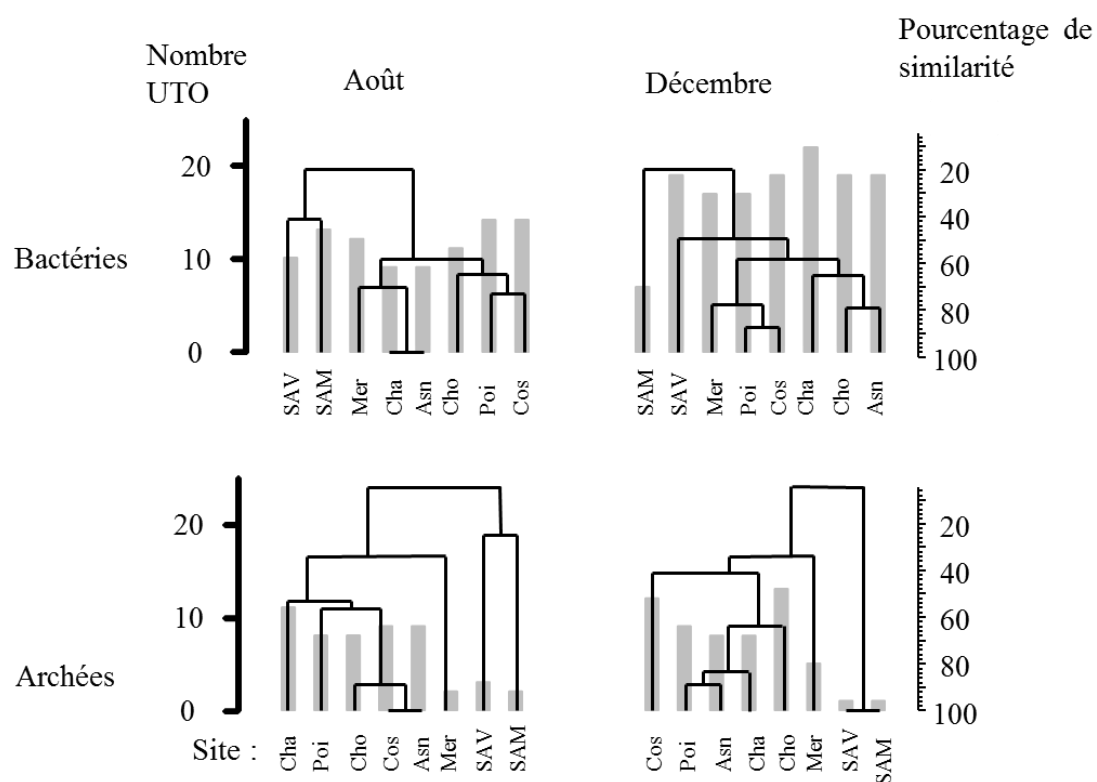


Figure 34 - Diversité des Procaryotes oxydant l'ammonium, Bactéries (AOB) et Archées (AOA) en août et décembre. Le nombre d'UTO est représenté sous forme de diagramme, avec l'échelle à gauche, et la similarité sous forme de dendrogramme, avec l'échelle à droite.

## IV. Discussion

Cette étude repose principalement sur la technique de DGGE, qui permet donc d'avoir une idée de la diversité de structure d'une communauté, mais il faut garder à l'esprit que la diversité réelle est plus importante que celle obtenue. La structure de la communauté des Procaryotes a été obtenue grâce à l'analyse du gène de l'ADNr 16S (gène taxonomique) et la structure de la communauté des Procaryotes oxydateurs de l'ammonium a été obtenue au moyen du gène *amoA* (gène fonctionnel). De plus, l'analyse de la diversité des NOB n'a pas été conduite dans cette étude, car les outils n'étaient pas disponibles pour ces groupes microbiens au moment de l'étude.

Les résultats de cette étude montrent que l'influence des rejets de la STEP SAV est plus importante sur les communautés bactériennes qu'archéennes. Cette observation est valable tant pour les communautés microbiennes totales (Figure 33), que pour les communautés oxydatrices de l'ammonium (Figure 34). Il est également important de noter que la richesse spécifique est plus importante pour les Bactéries que pour les Archées, tant pour l'ensemble des communautés bactériennes que pour les oxydants de l'ammonium. Il est possible que la technique utilisée (DGGE) soit responsable de cette différence, car elle masque les séquences rares. Il faut garder à l'esprit que la première étape de PCR amplifie l'ADN de façon exponentielle, ce qui conduit à masquer les séquences rares dans l'échantillon à analyser. Cependant, l'utilisation du pyroséquençage montre également une disparité entre richesse spécifique des Bactéries et des Archées dans d'autres environnements (Roesch et al. (2007)). Ces auteurs ont ainsi montré que les séquences archéennes représentaient entre 0,0009 % (sols forestiers) et 4-12 % (sols agricoles) de l'ensemble des séquences obtenues dans différents environnements. L'augmentation de la richesse en Archées entre les sols forestiers et agricoles serait selon Roesch et al. (2007) le résultat d'une influence anthropique, et plus encore pour les AOA qui sont favorisés par les fertilisants azotés.

Dans les STEPs, il a été montré que les différents types d'AOA sont extrêmement dépendants d'une niche écologique restreinte (Liu et al., 2011) avec notamment des conditions spécifiques de pH, oxygène dissous et nutriments. Au regard de ces informations, la faible diversité des AOA dans les effluents des STEPs parisiennes est conforme aux attentes. Le faible impact de ces communautés AOA en provenance des STEPs sur celles de la Seine peut donc s'expliquer par les différences des conditions physicochimiques de ces

deux environnements. Les STEPs sont des environnements dont la composition microbienne est extrêmement dépendante des traitements de l'eau (*e.g.* boues activées, nitrification), ainsi que des eaux traitées (*e.g.* effluents industrielles, domestiques) (Jaranowska et al., 2013). Les traitements dans les STEPs de l'agglomération parisienne sont complexes, car elles reçoivent des effluents très divers (Rocher et al., 2012b, Rocher et al., 2012a). Les effluents de STEPs sont en effet un milieu riche en azote et en matière organique qui est probablement moins favorable aux types d'AOA présents dans l'environnement, où l'azote, malgré les contaminations par les fertilisants ainsi que la matière organique, est en moins grande quantité.

Les communautés nitrifiantes de la basse Seine, des Bactéries surtout, sont donc soumises à l'influence anthropique, principalement au travers des effluents des stations d'épuration de la région parisienne. La STEP SAV, la plus importante, possède en effet une unité de nitrification depuis 2007 qui utilise les organismes nitrifiants pour éliminer l'ammonium, et représente une source de Procaryotes pour l'environnement. Cependant, la richesse spécifique des AOB dans les rejets de la STEP SAV est similaire pour la période 2012-2013 (13 UTO en août et 19 UTO en décembre 2012) et celle de 2002-2003, avant la mise en place des nouveaux traitements en STEPs (12 en juillet 2002, 13 en septembre 2002 et 2003) (Cébron et al., 2004). Bien que les indices de similarité n'aient pas été appréhendés à cette dernière période, l'impact des rejets de la STEP SAV sur la structure de la communauté AOB est visible, avec une modification de la structure de la communauté AOB plus forte sur la Seine avant les changements de traitement qu'actuellement. Plusieurs UTO provenant des rejets de la STEP SAV étaient retrouvés dans la Seine en aval jusqu'à l'estuaire, alors que ce phénomène est moins important pour la période actuelle. Il est probable que cette persistance des Procaryotes issus des rejets de STEP pour la période 2002-2003 trouve son origine dans les forts rejets d'ammonium dans la Seine. Cette différence de richesse entre Bactéries et Archées peut également être à l'origine d'une disparité dans leur importance environnementale. Il a en effet été montré par Bel et al. (2005) qu'une faible diversité dans une communauté fonctionnelle conduit à une activité écologique plus faible. Il est cependant important de noter qu'un seuil peut être atteint, au-delà duquel une augmentation de la richesse spécifique n'augmente pas l'activité d'une communauté (Hewson and Fuhrman, 2004), principalement dans des environnements complexes et hétérogènes.

La diversité d'une communauté n'est cependant pas nécessairement liée à son abondance. Ainsi, malgré la disparité entre la richesse bactérienne, un nombre d'UTO plus

grand que celui des Archées, il a en effet été montré dans différents environnements que les AOA peuvent être plus abondantes que les AOB (Sonthiphand et al., 2013, Mussmann et al., 2011). En outre, l'abondance et la diversité d'une communauté n'est pas non plus reliée à son activité comme mentionné pour les AOA par Sonthiphand et al. (2013).

Il apparaît donc au total que les Bactéries ont une richesse en UTO plus forte que les Archées dans la Seine et ses STEPs, tant pour l'ensemble des communautés que les communautés fonctionnelles. Cette différence est potentiellement liée à la forte dépendance des Archées à une niche écologique (*e.g.* pH, concentration en substrat et température), ce qui fait que l'impact des rejets des STEPs sur les communautés archéennes de la Seine est faible alors que l'impact sur les communautés bactériennes est plus fort. La plus faible richesse en UTO peut donc conduire à un rôle écologique moindre des Archées par rapport aux Bactéries en raison de leur dépendance à une niche. Cependant, la faible richesse en OTU des AOA (et des Archées en général) n'est pas automatiquement liée à une plus faible abondance de ces organismes. En termes de pourcentage de similarité (cf Figures 33 et 34), l'impact des STEPs sur les Procaryotes de l'environnement concerne principalement les Bactéries, l'indice de similarité étant plus faible entre STEP et environnement pour les Archées que pour les Bactéries.

Cependant, même si l'impact des apports de STEPs est faible sur la richesse en UTO et la structure des communautés archéennes, il est possible que l'abondance de ces organismes soit modifiée par ces apports. Le lien entre diversité des communautés nitrifiantes et leur abondance dans la Seine et ses STEPs sera établi au chapitre suivant (IV-3) qui traite de la quantification des Procaryotes nitrifiants dans la Seine et ses STEPs.

C. Les Procaryotes impliqués dans la dynamique du  
nitrite dans la colonne d'eau dans la Seine

---





# Nitrite oxidizers dominate nitrifiers in the water column of the Seine River, France

Thibaut Cazier<sup>1\*</sup>, Mélanie Raimonet<sup>1,2</sup>, Vincent Rocher<sup>3</sup>, Céline Roose-Amsaleg<sup>1</sup>, Josette Garnier<sup>1</sup>, Anniet M. Laverman<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> UPMC / CNRS, METIS UMR 7619, Box 105, 4 place Jussieu, 75252 Paris, France

<sup>2</sup> CNRS /UBO /IRD /IFREMER Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

<sup>3</sup> SIAAP, Direction du Développement et de la Prospective, 82 Avenue Kléber 92700 Colombes, France

<sup>4</sup> Université de Rennes 1, **ECOBIO UMR 6553**, 263 Avenue du Général Leclerc 35042 RENNES Cedex, France

\*Corresponding author: anniet.laverman@univ-rennes1.fr

En révision en vue d'une soumission dans 'International Journal of Limnology'

## Abstract

Nitrite concentrations exceed the European norm in the lower Seine River (France), discharged by the main Parisian waste water treatment plant (WWTP). In the oxygenated water column, nitrite is produced and consumed by respectively ammonia and nitrite oxidizers. However, in the Seine River nitrite persists, suggesting sub-optimal nitrite oxidation and possible low nitrite oxidizer abundance. In this study, the numbers of ammonia and nitrite oxidizing Prokaryotes in the Seine River were determined by qPCR in order to explain the persistence of nitrite. The results showed that nitrite oxidizers were abundant, outnumbering ammonia oxidizers, with *Nitrobacter* spp dominating in the Seine River, and *Nitrospira* spp in the WWTP outlets. Among the ammonia oxidizers, Archaeal numbers were highest in the river water, whereas Bacteria dominated in the WWTP outlets. The dominance of *Nitrospira* spp and AOB in the WWTP is in line with efficient nitrification. However, it appears that the abundant nitrite oxidizers were incapable of efficiently oxidizing nitrite, considering its elevated concentrations in the water column up to 30 km downstream of the WWTP. It is hypothesized that nitrite oxidizers exhibit mixotrophic activity or are inhibited (*e.g.* antibiotics, metals) in the anthropogenically impacted Seine River (*e.g.* by antibiotics and metals), not excluding a possible limitation of nitrite oxidizers' activity due to their relatively low affinity with nitrite (high  $K_M$ ).

## I. Introduction

Human activities perturb the environment, particularly water quality and aquatic life by increasing the nitrogen load. Large rivers are impacted by this increase in nitrogen via agriculture and wastewater treatment (Son and Carlson, 2012, Merseburger et al., 2011, Cébron et al., 2003). The inorganic nitrogen in these systems undergoes biogeochemical transformations, being dominated by microbial activity (Galloway et al., 2004). In the water column of large rivers, nitrification, the oxidation of ammonium by oxygen to nitrate via nitrite is an important process (Mulholland et al., 2000, Spieck and Lipski, 2011). Nitrification transforms reduced inorganic nitrogen ( $\text{NH}_4^+$ ) to an oxidized form ( $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ ) and is carried out by ammonia oxidizing and nitrite oxidizing Prokaryotes, respectively. Other microbial mediated processes (*e.g.* denitrification, anammox, dissimilatory nitrate reduction to ammonium) are capable of reduction of nitrate or nitrite, albeit under anoxic conditions. In large well-aerated river water, these processes are less important than nitrification, but may occur in river sediment or in suspended particles (Galloway et al., 2004).

Nitrification in the water column was responsible for a steady decline in ammonium concentrations along the Seine River downstream of Paris until 2007 (Cébron et al., 2003, Cébron et al., 2004, Cébron and Garnier, 2005). Since 2007, due to changes in the largest Parisian waste water treatment plant (WWTP), the ammonia load of the Seine River downstream of Paris decreased from 57 tons  $\text{N-NH}_4^+ \text{ day}^{-1}$  to 13 tons of  $\text{N-NH}_4^+ \text{ day}^{-1}$  after 2007, (Aissa-Grouz et al., 2015). Whereas the ammonia discharge decreased, nitrite concentrations remained elevated in the WWTP outlet from 0.75 tons  $\text{N-NO}_2^-$  before to 2.2 tons  $\text{N-NO}_2^- \text{ day}^{-1}$  afterward (Aissa-Grouz et al., 2015). High concentrations of nitrite are present in the Seine River at least 120 km downstream of Paris until the estuary (Raimonet et al., 2015). The presence of nitrite is of concern as it can lead to perturbations of the macro- and microfauna, nitrite being toxic at concentrations higher than  $0.7 \mu\text{M}$  for most water life (Jensen, 2003). Therefore, a European norm of  $1.4 \mu\text{M NO}_2^-$  has been set by the European Council Directive (ECD) in 2006 for rivers. In several European rivers nitrite concentrations exceed this norm (Kelso et al., 1997, Kelso et al., 1999, House and Warwick, 1998) as well as in the Seine River downstream of Paris (Garnier et al., 2007, Raimonet et al., 2015).

The presence and persistence of nitrite in the water column suggests an inefficiency of nitrite oxidation to nitrate or an additional source of nitrite from incomplete benthic

denitrification. In general, ammonia and nitrite oxidizers, two distinct groups of Prokaryotes, operate in close harmony, producing nitrate without accumulating nitrite (Kowalchuk and Stephen, 2001). However, nitrite build up has been observed at high pH ( $> 8$ ), elevated temperature or high ammonium concentrations (Bae et al., 2001). Oxygen depletion also impacts nitrite oxidation more than ammonia oxidation (Ruiz et al., 2003). In short, environmental variables such as temperature, pH,  $O_2$  and ammonium concentrations (Bae et al., 2001, Ruiz et al., 2003, Wang and Yang, 2004, Kim et al., 2006, Anthonisen et al., 1976, Gieseke et al., 2003) may lead to a variation in ammonia and nitrite oxidizing efficiency and potentially nitrite accumulation.

Among the nitrifiers, the ammonia oxidizers (AO) are separated in ammonia oxidizing bacteria (AOB), with several genera, with the most well-known being *Nitrosomonas* and *Nitrospira* (Kowalchuk and Stephen, 2001) and ammonia oxidizing archaea (AOA) (French et al., 2012). The AOB are slow growers, however AOA are known to exhibit even lower growth rates (French et al., 2012). Nitrite oxidizers (NOB) are only found in the domain Bacteria and are less diverse with five genera known until now: *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* and *Nitrotoga* (Spieck and Lipski, 2011). Most studied NOBs have a growth rate of one generation per day (Munz et al., 2011), roughly similar to those of AOB. Difference in abundance or diversity of the two groups of Prokaryotes might also lead to nitrite accumulation, for example due to low abundance or little efficient nitrite oxidizers.

Studies investigating the numbers and diversity of AO and NO in river water are scarce, and in general not investigated at the same time. Among the AO, the genera *Nitrosomonas* dominated in the Seine River, France (Cébron et al., 2004, Cébron and Garnier, 2005), AOA were not investigated. In the Grand River, Canada, ammonia oxidizers were dominated by Archaea (Sonthiphand et al., 2013, Leininger et al., 2006). In soils and the marine environment AOA have shown to dominate over AOB (Leininger et al., 2006, Francis et al., 2005, Coolen et al., 2007). In WWTP ammonia oxidizing bacteria are generally most abundant (Jin et al., 2010). In the Seine River, both *Nitrospira* and *Nitrobacter* spp were quantified in the water column as well as in the WWTP outlet (Cébron and Garnier, 2005). Both *Nitrobacter* and *Nitrospira* were also determined in a Californian WWTP (Huang et al., 2010). Other studies showed a dominance of *Nitrospira* in WWTPs (Schramm et al., 1998, Daims et al., 2001, Burrell et al., 1998).

In order to understand the fate of nitrite issued from WWTP effluent and in the water column of the Seine River and to possibly guide stakeholders for mitigation, the goal of this

study was to quantify the two main groups of ammonia oxidizers (Bacteria and Archaea) as well as the two main groups (genera) of nitrite oxidizers (*Nitrobacter* spp and *Nitrospira* spp). The abundance of the different groups was obtained by quantitative PCR (qPCR) and related to the environmental variables such as inorganic nitrogen species and dissolved organic carbon. Samples were taken at different sites and times, upstream and downstream of Paris and its major WWTP to study the dynamics of nitrifiers on longitudinal and temporal scales. We hypothesize that nitrite oxidizers are either in abundance similar to ammonia oxidizers, or are less efficient than them in the conditions found in the Seine River if their abundance is higher, as was found in 2002-2003. This study will aim to disprove one of these hypotheses by quantifying the nitrifiers present in the Seine River.

## **II. Material and methods**

### **II.1. Sampling sites, samples collection and analysis**

The Seine River watershed is located in the northern half and the most heavily populated areas of France (see for more information (Raimonet et al., 2015)). Samples from the Seine River and Waste Water effluents of the two main WWTPS were collected monthly between March 2012 and February 2013, an overview of the different sampling sites can be found in Figure 35. Sampling sites were chosen according to their location upstream and downstream of the two main WWTPs along a 50 km stretch of the Seine. Samples were collected at Asnières, located in between the two WWTPs and at Poissy, downstream of both WWTPs. The outlets of the Seine Amont WWTP (SAM, upstream of Paris) and Seine Aval WWTP (SAV, downstream of Paris) were sampled at the same time as sampling of the water column at Asnières and Poissy.

The two WWTPs, one upstream (Seine Amont) and the other downstream (Seine Aval) of Paris, are managed by the 'Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne' (SIAAP). The Seine Amont (SAM) WWTP receives 600 000 m<sup>3</sup> of wastewater per day, after pre-treatment to remove large particles the carbon and nitrogen is removed in an extended aeration activated sludge unit. The first zone operates under oxic conditions allowing removal of carbon and nitrification of ammonium, whereas a second zone operates under anoxic conditions to remove nitrate. The Seine Aval (SAV) WWTP treats 80% of the Parisian waste water, with a treatment capacity of 1 700 000 m<sup>3</sup> day<sup>-1</sup> (1 500 000 m<sup>3</sup>/day after reduction and modernization). After removal of particles, carbon and phosphorous the effluent is nitrified to remove ammonia, after which nitrate is treated by denitrification before the remaining nitrogen is released in the environment (Rocher et al., 2012b, Rocher et al., 2012a).

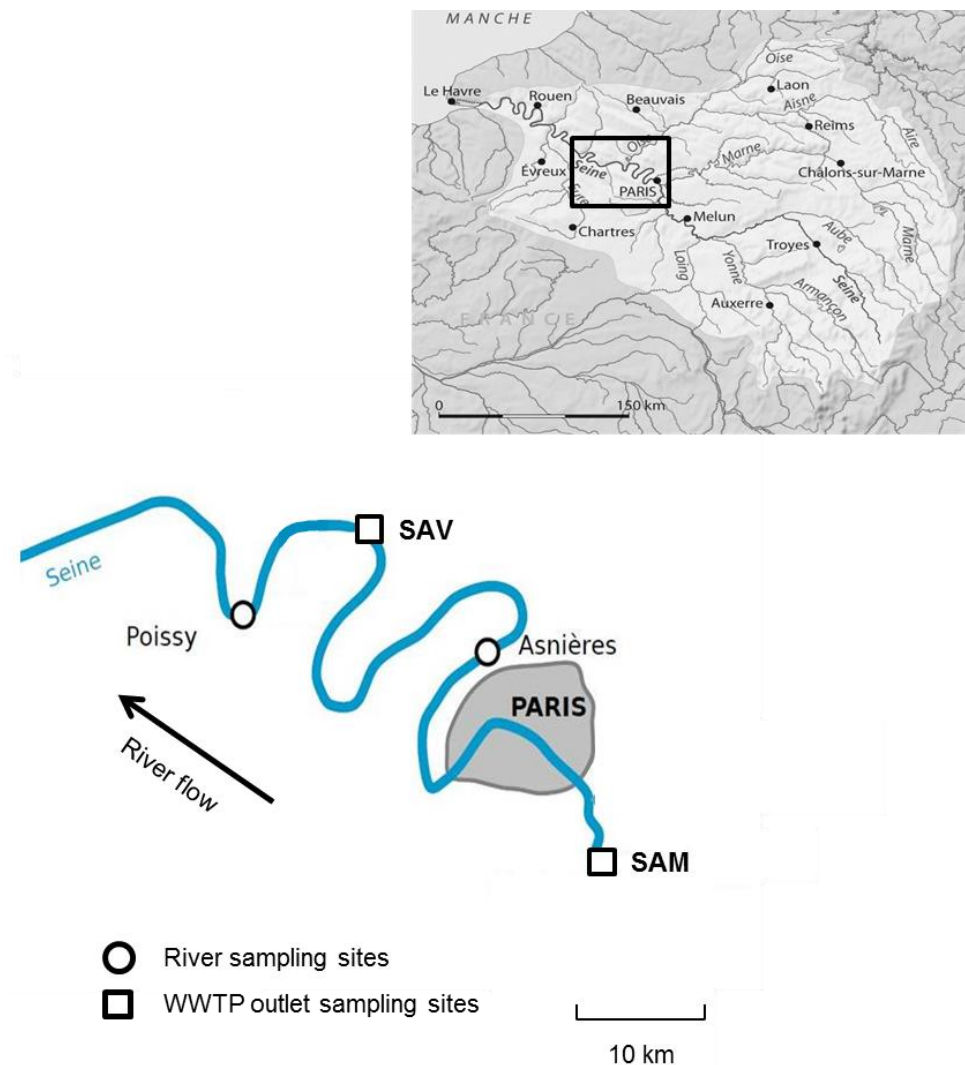


Figure 35 - Map of the Seine River around Paris with sampling sites used in this study. Upstream to downstream; Choisy (Cho) is located upstream of Paris, the Seine Amont WWTP outlets (SAM), Charenton (Cha) located along the Marne River upstream of Paris, Asnière (Asn), the Seine Aval WWTP outlets (SAV), Conflans/Seine (Cos), Poissy (Poi) and Méricourt (Mer) are located along the Seine River.

Seine River water samples were collected with buckets from the center of bridges spanning the Seine River. Water samples were transferred to 2 L plastic bottles, placed in a cooler and transported to the laboratory for chemical analysis. Within 6 hours after sampling, water samples were filtered on a 0.22  $\mu\text{m}$  pore PolyVinylidene Fluoride filter (PVDF Millipore, Germany), the filtered water was used for nutrient analysis. The filters were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 1.5 mL Eppendorf tube (Eppendorf, Germany) for DNA extraction. Depending on the amount of suspended particulate matter (SPM) load of each sample, between 50 to 200 mL was filtered on a 0.7  $\mu\text{m}$  pore GF/F glass fiber filter (GE healthcare life science, USA).



Nitrite concentrations were by colorimetry according to Rodier (1984), using sulfanilamide (1% w/v) and *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (0.05% w/v) and analyzed at 540 nm with a Spectrostar nano (BMG labtech, Germany) spectrometer. Water samples for Dissolved Organic Carbon (DOC) were acidified (0.1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M in 30 mL) and stored until analyses on an Aurora 1030 TOC Analyzer (OI Analytical/Xylem Inc., USA) at 4°C. SPM concentrations were measured by drying the 0.7µm pore GF/F glass fibre 24h at 104°C before weighting. At the different sampling sites, pH and flowrates were determined. In addition ammonium and nitrate were measured at the SIAAP COFFRAC laboratory. Ammonium were measured according to the ISO 11732 protocol (NF, French Norm), and nitrate according to the ISO 10304-1 (NF).

## **II.2. DNA extraction and molecular analysis**

DNA extraction was performed with a Mobio Powersoil DNA isolation Kit (Mobio, USA). DNA was eluted in 100µL elution buffer and quantified with a SPECRTOSTAR nano spectrometer (BMG labtech, Germany) using an LVis plate (BMG labtech, Germany) adapted for low volume samples (2µl).

The number gene copies of the different groups of Prokaryotes were determined by qPCR using primer concentrations and conditions as indicated in Table 1. The qPCR reactions were conducted in a final volume of 10µL, with 5µL of 2x Mastermix, primer at 0.4 to 0.8 µM concentration (see Table 7) and 3 to 8 ng DNA. All qPCR reactions were done in triplicate and carried out with a LightCycler480 (Roche, USA). Standards for the different qPCRs were obtained by cloning the targeted fragments from pure cultures or environmental samples depending on the sequence (see Table 7). Plasmids containing the fragments were extracted with a NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid kit (Macherey-Nagel, Germany). Prior to qPCR, standards (plasmids) and genomic DNA were quantified with a SPECTROstar nano and LVis plate (BMG labtech, Germany). The plasmids and the genomic DNA were ten-fold serial-diluted in order to obtain a range of 10<sup>2</sup> to 10<sup>8</sup> copies of the targeted gene standard curve. The specificity of amplification of the qPCR made with SYBRGreen coloration was verified with the melting curve; temperature of denaturation of the amplified sequences (LightCycler 480 software and thermocycler, Roche, USA). The efficiency of the qPCR reaction was kept between 1.8 and 2, indicating an increase in fluorescence between 1.8 and 2 times per cycle and an error (mean squared error of the single data points fit to the regression line) below 0.2

for the standard curve. Results obtained with qPCR were displayed in gene copy number per g of suspended particulate matter (SPM).

The impact of WWTPs on the nitrifying abundance in the Seine River was estimated by determining the flux of total Prokaryotes at the different sampling points. This flux was calculated using the flow rates ( $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ ), the SPM load ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and nitrifier abundance (gene copies  $\text{g SPM}^{-1}$ ), resulting in a number of gene copies per second at the different sites.

The primer used in the study target different Prokaryotic communities through different genes. Some primer target taxonomic genes (16S rDNA) for a large community (general Bacteria or Archaea) or a specific group (*Nitrospira*), while others target functional genes (*amoA* and *nxrA*). For the unspecific primers, operon number of the 16S is between 1 and 15 copies per Bacteria (Klappenbach et al., 2000), and between 1 and 5 for Archaea (Acinas et al., 2004). As a consequence, the quantification of total Bacteria's and Archaea's 16S obtained in this study is more an index of their real abundance, within a 10-fold range of this real abundance. For the nitrifying groups, the correlation between the index (quantification of the targeted gene) and the real abundance is tighter. The use of the PrimerBLAST tool of the NCBI allowed us to determine that the *amoA* gene was present in 1 or 2 copies in the Bacteria (AOB), and in only 1 copy in the Archaea (AOA). This tool also enabled us to determine that the *nxrA* gene was present in one copy in the *Nitrobacter* genera, and that the specific 16S rDNA sequence targeted by the primers we used was also present in only one copy per genome in *Nitrospira* Bacteria. As a consequence, the quantification of the genes gives us an index of the nitrifiers' abundance that is close to their true abundance.

### II.3. Statistical analysis

After a Shapiro-Wilk normality test, the one-way ANOVA Kruskal-Wallis test was used to determine if the differences between the samples of a group (*e.g.* the twelve sampling dates for one site) were significant with SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.). Further analyses were performed with pairwise comparison (Tukey) to determine the significant variations between sample groups. When comparing two groups (up and downstream of SAV), a non-parametric Mann-Whitney test was used. Principal Component Analysis (PCA) and canonical correspondence analysis (CCorA) was performed on microbial abundance data with Xlstat (Addinsoft, France).

Table 7 - Overview of the primers used for qPCR, concentrations used, thermocycler program, reaction mix and origin of the standards.

Target gene	Primer	Amplicon size	PCR conditions	Mastermix	qPCR standard	Reference
Bacterial 16S	63F	278 bp	15° 95° ; 30° 64° ; 30° 72° (x40)	SensFast SYBR no-Rox MasterMix (Bioline, UK)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	Murkesi et al., 1998
	BU16S4					Muyzer et al., 1993
Archaeal 16S	Arch806F	110 pb	10° 95° ; 30° 60° ; 30° 72° (x40)	SensFast SYBR no-Rox MasterMix (Bioline, UK)	<i>Nitrososphaera viennensis</i>	Takai et al., 2000
	Arch915R					Stahl & Ananin, 1991
AOB amoA	amoA_1F	491 bp	10° 95° ; 30° 60° ; 30° 72° (x40)	LightCycler 480 SYBR Green MasterMix (Roche, USA)	Clone issu de l'environnement	Ronhaawe et al, 1997
	AmoA_2R					
AOA amoA	A23F	629 bp	10° 95° ; 30° 60° ; 30° 72° (x40)	LightCycler 480 SYBR Green MasterMix (Roche, USA)	Clone issu de l'environnement	Sahan & Muyzer 2008
	A616R					
<i>Nitrobacter ncvA</i>	F1 ncvA	323 pb	30° 95° ; 45° 55° ; 45° 72° (x35)	SensFast SYBR no-Rox MasterMix (Bioline, UK)	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	Wertz et al. 2008
	R2 ncvA					
16S <i>Nitrosopina</i> *	NIRSU_130F	152 pb	10° 95° ; 30° 57° ; 30° 72° (x40)	SensFast SYBR no-Rox MasterMix (Bioline, UK)	<i>Nitrosopina gracilis</i> 3/211	Mincer et al., 2007
	NIRSU_282R					
<i>Nitrosopina</i> 16S rDNA	NSRI113F	151 bp	20° 95° ; 60° 63° (x55)	SensFast Probe no-Rox MasterMix (Bioline, UK)	<i>Nitrosopina deflavii</i> A17	Dionisi et al., 2003
	NSRI1264r					
	NSRI1437tag					

### III. Results

#### III.1. Environmental variables

Highest nitrite concentrations were measured in the effluent of the SAV WWTP outlet, up to  $324.6 \mu\text{M NO}_2^-$ , always exceeding those in the Seine River, about  $10\text{-}20 \mu\text{M NO}_2^-$  (Figure 36, Table 9). This is due to the partial efficiency of the denitrification treatment in the SAV WWTP, causing nitrite to be produced during nitrogen removal. A large variation in nitrite concentrations, ranging from  $0.7$  to  $99.4 \mu\text{M NO}_2^-$  were measured in the outlet of the SAM WWTP with a mean of  $8.2 \mu\text{M NO}_2^-$ . Significant differences (Tukey test,  $p < 0.05$ ) were observed between the 2 WWTPs, with the highest average nitrite concentrations detected in the SAV WWTP outlet at  $165.0 \mu\text{M NO}_2^- (\pm 108.0)$ . At Poissy downstream of Paris concentrations were on average  $13.4 \mu\text{M NO}_2^- (\pm 5.6)$ .

Ammonium concentrations increased significantly (Tukey test,  $p < 0.05$ ) along the Seine River passing Paris, with concentrations of  $7.9 \mu\text{M NH}_4^+ (\pm 6.3)$  at Asnières and  $36.9 \mu\text{M NH}_4^+ (\pm 44.2)$  at Poissy (Figure 36, Table 9). Ammonium concentrations were an average of  $10.8 \mu\text{M NH}_4^+ (\pm 14.0)$  in the SAM outlets, significantly higher (Tukey test,  $p < 0.05$ ) in the SAV outlets with an average annual concentration of  $382.2 \mu\text{M NH}_4^+ (\pm 316.1)$ .

In the environment, nitrate concentrations showed little variation (no significant difference) along the Seine River; nitrate averaged from  $351.2 \mu\text{M NO}_3^- (\pm 69.1)$  at Asnières and  $353.6 \mu\text{M NO}_3^- (\pm 66.9)$  at Poissy. In the SAM outlets, nitrate was present in high concentrations, up to  $1105.3 \mu\text{M NO}_3^- (\pm 151.9)$ . In the SAV outlets, nitrate concentrations were not significantly different from the environment with average concentrations of  $375.7 \mu\text{M NO}_3^- (\pm 192.7)$ .

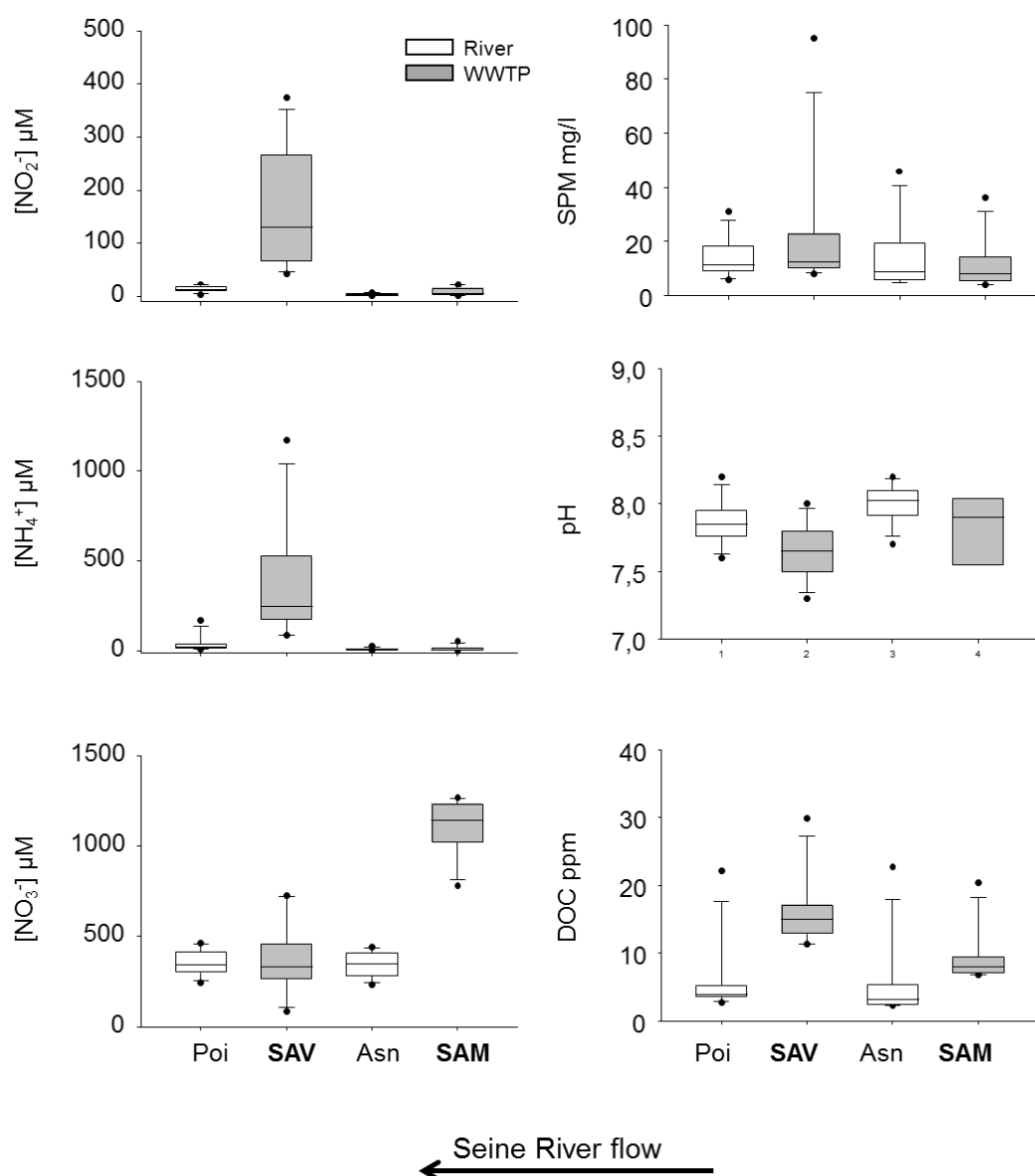


Figure 36 - Concentrations of the different dissolved nitrogen species, nitrite, ammonium and nitrate ( $\mu\text{M}$ ), suspended particulate matter (SPM in  $\text{mg.l}^{-1}$ ), pH, and dissolved organic carbon (DOC in ppm) along the Seine River (monthly annual sampling, March 2012-February 2013). The stations are indicated from left to right (see Fig.35); Seine Amont (SAM), Asnières (Asn) Seine Aval (SAV), Poissy (Poi). The boxes indicate the median with the 1st and 3rd quartiles as the boundaries of the box. The whiskers represent the 5th and 95th percentile, and the dots represent outlying data observed. For more detailed information regarding the different environmental parameters, see Table 9

The flow rates of the Seine River and WWTP outlets are important to determine the relative importance of the WWTP outlets in the Seine River and their possible impact on the environment. The flow rates of the SAM WWTP outlets ( $4.7 \pm 1.1 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) represented 2% ( $\pm 1$ )

of the Seine River flow rate at the station Asnières (Table 9). The outlets of the SAV WWTP were much higher ( $20.9 \pm 4.6 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) and represented 10% ( $\pm 8$ ) of the flow of the Seine River at Asnières, upstream of the SAV WWTP. The suspended particulate matter (SPM) concentrations did not significantly vary between the stations; neither in the environment nor in the WWTP outlets, with average levels of  $14.6 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 12.3$ ) at Asnières, and  $14.1 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 7.1$ ) at Poissy. SPM were slightly lower in the SAM outlets than in the river ( $11.1 \pm 9.1 \text{ mg L}^{-1}$ ), but slightly higher in the SAV outlets than in the water column ( $20.9 \pm 24.1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Dissolved organic carbon concentrations (DOC) were significantly higher in the WWTP ( $12.7 \pm 5.6 \text{ mgC L}^{-1}$ ) than in the environment ( $5.4 \pm 5.1 \text{ mgC L}^{-1}$ ; Tukey test,  $p < 0.05$ ), but no significant difference was observed in the environment between up and downstream of Paris (Fig. 2, SI Table 1). The pH decreased significantly (Tukey test,  $p < 0.05$ ) along the Seine River between  $8.1 \pm 0.1$  at Asnières and  $7.9 \pm 0.1$  at Poissy (Figure 36, Table 9). In the WWTP outlets, pH was significantly lower ( $7.7 \pm 0.2$  for SAM and SAV, Tukey test,  $p < 0.05$ ) than in the Seine River water.

### III.2. Microbial abundance in the water column and WWTP outlet

The total number of gene copies of Prokaryotes and different groups of nitrifiers in the water column at Asnières and Poissy as well as in the outlet of the WWTPs SAM and SAV are presented in Figure 37 (for details see Table 10). This numbers of gene copies is an index used to approximate the number of Prokaryotes targeted, and in this paper ‘gene copy number’, ‘index’ and ‘cell abundance’ will be used indifferently to refer to qPCR results. Gene copy numbers are expressed by g of dry SPM because nitrifiers are mostly attached to particles and previous study on the Seine River also expressed the results per g of dry SPM, and thus facilitate comparison with anterior data. This will also enable an easier comparison with the results that will be obtained in the sediment were results will be expressed per g of dry sediment. Numbers of bacterial gene copies varied between  $7.4 \cdot 10^{10}$  and  $4.9 \cdot 10^{12} \text{ g SPM}^{-1}$  in the water column and were highest in the WWTP outlets (between  $0.2$  and  $5.3 \cdot 10^{12}$  gene copies  $\text{g SPM}^{-1}$ ). Archaeal gene copy numbers were similar to bacterial numbers reaching  $2.0 \cdot 10^{12} \text{ g SPM}^{-1}$  in the water column at Asnières and  $7.3 \cdot 10^{12} \text{ g SPM}^{-1}$  at Poissy. The WWTP outlets contained similar numbers of the archaeal 16s rRNA gene, on average  $2.9 \cdot 10^{12}$  gene copies  $\text{g SPM}^{-1}$  for the SAM outlet and  $2.7 \cdot 10^{12}$  gene copies  $\text{g SPM}^{-1}$  for the SAV outlet,

comparable also to the numbers in the water column (see Figure 37). The index numbers of ammonia oxidizing bacteria varied between  $4.2 \cdot 10^8$  and  $1.2 \cdot 10^9$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> at Asnières and Poissy respectively, whereas higher numbers were present in both WWTP outlets (up to  $1.1 \cdot 10^{11}$  gene copies g SPM<sup>-1</sup>). In contrast to the index numbers of AOB, the ammonia oxidizing archaeal indexes were similar in abundance in both water column and WWTP outlets, with average values of  $2.9 \cdot 10^9$  and  $5.1 \cdot 10^9$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> respectively. Both indexes for the two groups of nitrite oxidizing bacteria, *Nitrobacter* spp and *Nitrospira* spp, were more abundant in the WWTP outlets than in the water column. This difference was more pronounced for the *Nitrospira* spp index than for the *Nitrobacter* spp index (see Figure 37). The average numbers of the *Nitrobacter* genes were around  $8.5 \cdot 10^9$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> for the water column and  $4.2 \cdot 10^{10}$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> for the WWTP outlet, whereas low numbers of *Nitrospira* genes were detected in the water ( $7.2 \cdot 10^8$  gene copies g SPM<sup>-1</sup>) compared to relatively high numbers in the WWTP outlet ( $1.2 \cdot 10^{11}$  gene copies g SPM<sup>-1</sup>).

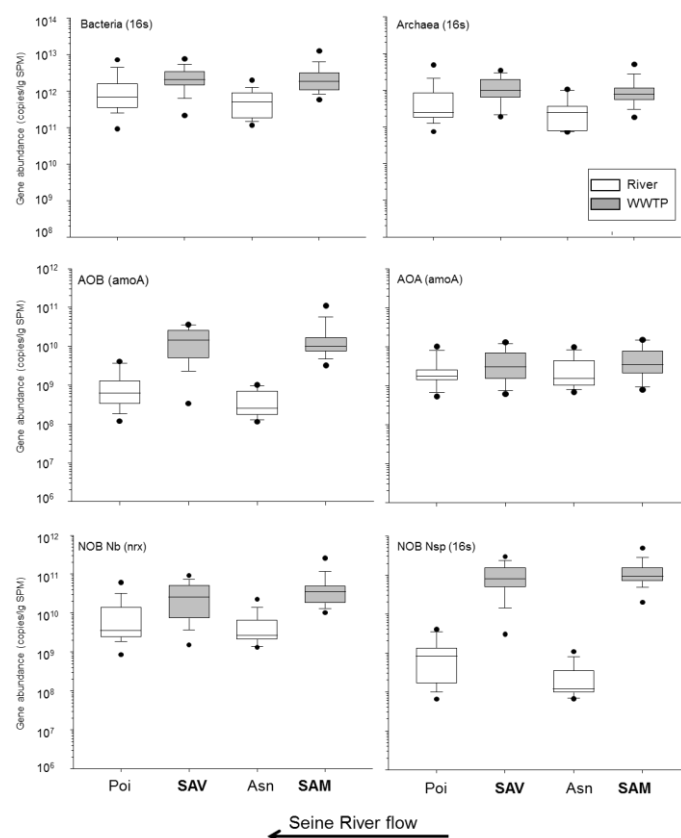


Figure 37 - Variation in the total Bacterial, archaeal, AOB, AOA, *Nitrobacter* and *Nitrospira* index numbers (gene copies g SPM<sup>-1</sup>) along the Seine River and two of its WWTP. Note the difference in scale for the copy numbers between bacteria/ archaea and the 4 groups of nitrifiers. Median gene copy numbers are indicated by boxplots with the 1st and 3rd quartiles as the boundaries of the box. Whiskers represent the 5th and 95th percentile, with the dots represent outliers. For more detailed information regarding the different nitrifier groups see Table 10. As seen in Figure 36, SPM are present in similar concentrations in the Seine River and the WWTP effluents, between 15 and 25 mg/L

A rough estimation by summation of the different nitrifying groups showed that nitrifying abundance in the WWTP outlets exceeded with one order of magnitude the numbers in the water column ( $1.9 \cdot 10^{11}$  versus  $1.3 \cdot 10^{10}$  gene copies g SPM<sup>-1</sup>, see Figure 37). The nitrifiers in the water column were dominated by *Nitrobacter* spp (2 time more numerous than the other nitrifiers combined), with ammonia oxidizing Archaea contributing for 1/4 of the nitrifiers. Both *Nitrospira* spp and the ammonia oxidizing bacteria represented 1/20. In the WWTP outlets *Nitrospira* spp dominated the NOB (2 time more numerous than the other nitrifiers combined), with an important contribution of *Nitrobacter* spp (1/4 of the total nitrifiers). The ammonia oxidizing bacteria were more abundant, representing 1/10, than the archaeal ammonia oxidizers contributing with 3% to the total numbers of nitrifiers. Please note that in both environments (river and WWTPs) nitrite oxidizers' indexes are 2.3 and 8.5 more numerous than the ammonia oxidizers.

The importance of SAV's discharge on the nitrifying population was relatively high all year long,  $7.3 \cdot 10^{16}$  ( $\pm 5.9$ ) nitrifiers gene copies.s<sup>-1</sup>, representing 1.7 times the amount at the Asnières sampling point where  $4.2 \cdot 10^{16}$  ( $\pm 4.2$ ) nitrifiers.s<sup>-1</sup> were detected. Total nitrifiers found at Poissy were on average  $11 \cdot 10^{16}$  ( $\pm 13$ ) nitrifiers.s<sup>-1</sup>, with  $1.1 \cdot 10^{16}$  ( $\pm 1.1$ ) nitrifiers.s<sup>-1</sup> in the SAM's discharge. Among the different groups of nitrifiers, AOB and *Nitrospira* genes fluxes were found in higher number in the WWTP effluent ( $0.71 \cdot 10^{16}$  AOB and  $4.6 \cdot 10^{16}$  *Nitrospira* gene copies.s<sup>-1</sup> SAV) than in the environment ( $0.18 \cdot 10^{16}$  AOB and  $1.2 \cdot 10^{16}$  *Nitrospira* copies.s<sup>-1</sup> Asnières). The gene copy numbers of AOA were lower in the WWTP discharge than in the river. The discharge of AOB and *Nitrospira* spp. had a significant impact (Mann-Whitney, p=0.010 and p=0.026 respectively) between Asnières and Poissy. The impact on AOA and *Nitrobacter* spp was not significant (Mann-Whitney, p=0.436 and p=0.089 respectively), neither was the impact on total nitrifier gene copy numbers (Mann-Whitney, p=0.089).

Figure 38 shows the seasonal relation between the different microbial abundances at Asnières and Poissy by Principal Component Analysis (PCA). The microbial abundances show variation throughout the year, whereas no clear seasonal pattern is visible (e.g. correlation between abundances in spring, summer, autumn or summer). The months May, July, August and September (Asnières) and May, June, August and September (Poissy) seem to indicate that during the summer month's microbial abundances is different from the other months.



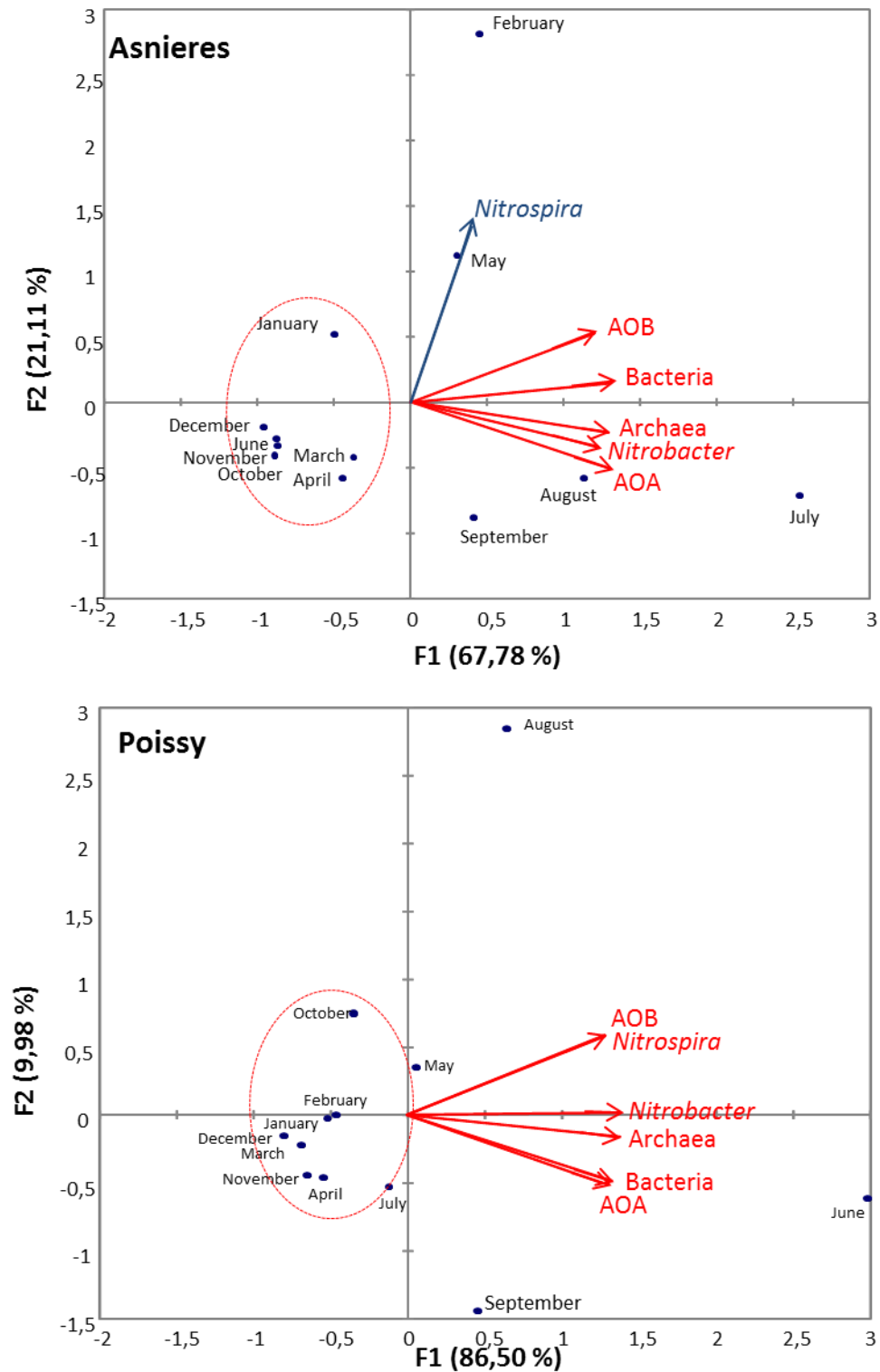


Figure 38 - Principal Component Analysis (PCA) bi-plot of the abundance of the different nitrifying groups (AOB, AOA, *Nitrobacter* spp and *Nitrospira* spp) and general *Bacteria* and *Archaea* for August and December 2012. The two principal components explain 88 and 95 % of the variance for respectively Asnières and Poissy. The contribution of the different microbial groups is represented by the length and angle to the PCA axes. Vectors pointing in the same directions indicate a positive correlation, whereas those in opposite direction indicate a negative correlation. Perpendicular vectors indicate no relation at all.

### III.3. Microbial abundance related to seasonal and environmental factors

A principal component analysis using the microbial abundances obtained during the different months was performed to evaluate a seasonal effect for Asnières and Poissy (Figure 39). Even though microbial abundances showed seasonal variation, no particular trends (per season) were observed. A canonical correspondence analysis (CCorA) was used to evaluate a possible correlation between environmental parameters and microbial abundance (Asnières and Poissy, Figure 39). Environmental parameters such as flow rates, pH, nitrate and DBO5 strongly correlated with the *Nitrospira* genera, and completely opposite (negative correlation) with nitrite concentrations. The AOA and *Nitrobacter* spp correlate well with nitrite concentrations. The AOB have no relation with either of these groups, and neither do the Bacteria or DOC concentrations.

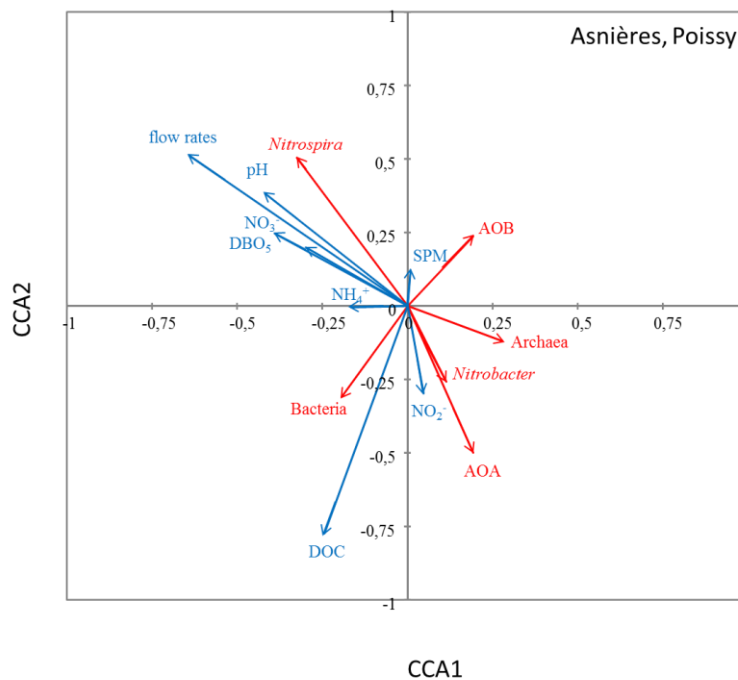


Figure 39 - Canonical Correspondence Analysis (CCA) ordination plot of the qPCR-estimated abundance for *amoA* (AOA and AOB), *NxrA* (*Nitrobacter*) 16s (*Nitrospira*, *Bacteria*, *Archaea*) in red and environmental data in blue. The contribution of the different environmental variables is represented by the length and angle to the CCA axes. Vectors pointing in the same directions indicate a positive correlation, whereas those in opposite direction indicate a negative correlation. Perpendicular vectors indicate no relation at all

## IV. Discussion

The results of this study showed the difference in the nitrifying community abundances in the Seine River and the two main WWTPs. We showed a dominance of nitrite over ammonia oxidizers in both river water and WWTP outlets (Figure 40). Among the ammonia oxidizers, AOA dominated over AOB in the river water column whereas AOB dominated over AOA in the WWTP outlets. Furthermore the nitrite oxidizers were dominated by the genus *Nitrobacter* spp in the Seine River, while *Nitrospira* prevailed in the WWTPs.

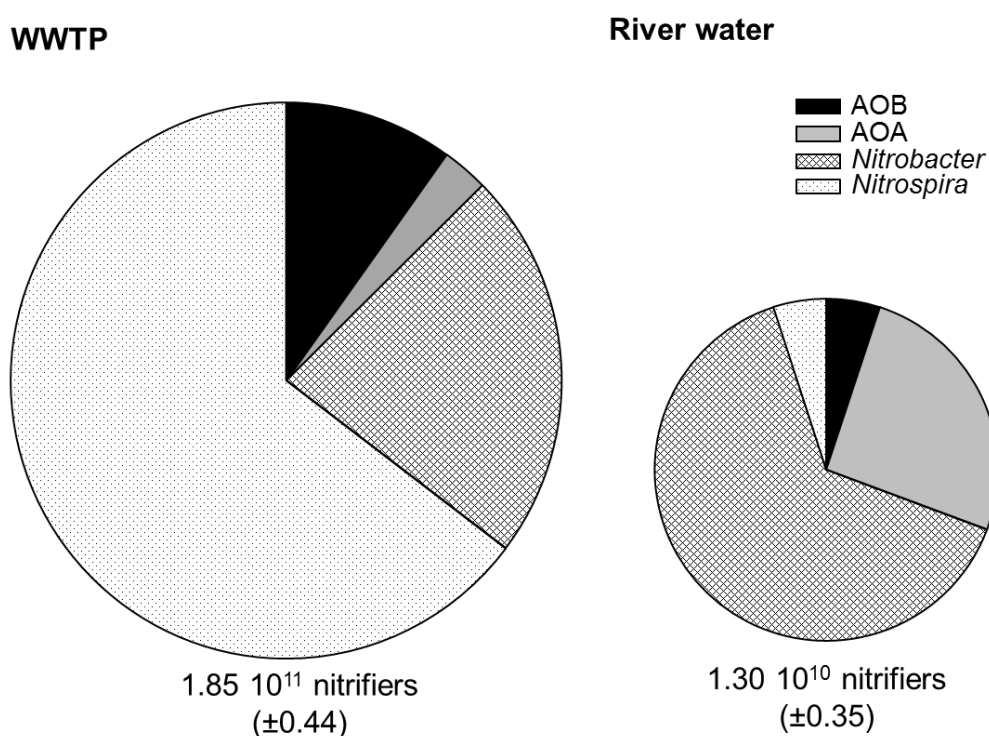


Figure 40 - Total abundance of the nitrifiers' genes in copy per g of dry SPM (mean and standard deviation) and the relative contributions of the different nitrifying groups in the effluents of the WWTP SAV and SAM (WWTP) and Seine River water Asnières and Poissy (Seine River).

The dominance of NOB over AO would be in line with the fact that ammonia oxidation is considered the rate limiting step in the nitrification process with a fast consumption of nitrite by the abundant NOB. The presence of relative high  $\text{NO}_2^-$  concentrations in the Seine reaching values up to  $21.7 \mu\text{M NO}_2^-$  in December 2012 at Poissy (Table 9), downstream of Paris (compared to the DCE value of  $0.7 \mu\text{M}$ ) indicate that the NOB were not efficient in eliminating  $\text{NO}_2^-$ . This is in agreement with the results by Raimonet et al. (In preparation), showing that in the Seine River water *in situ* nitrite oxidation rates were

similar to ammonia oxidation rates, *i.e.* the former being not sufficient to eliminate the excess of  $\text{NO}_2^-$  brought by the effluents but only to eliminate the nitrite produced *in situ*.

An imbalance between NOB and AO abundances has also been reported in other studies. NOB outnumbered AO by a factor 3-30 in the sediments of a eutrophic lake (Smorczewski and Schmidt, 1991) and in a WWTP (Winkler et al., 2012). In the Seine River, prior to the improvement of the SAV WWTP, numbers of NOB exceeded those of AOB (Cébron and Garnier, 2005, See Table 2), also with a dominance of *Nitrobacter* over *Nitrospira* spp. Overall the numbers of total nitrifiers were an order of magnitude higher in the current study compared to those found previously in the Seine River (Table 10 and Table 11) (Cébron et al., 2004, Cébron and Garnier, 2005). The discrepancy between the previous numbers and those found in the current study might be partly due to the numbers of AOA not determined in 2002-03 when appropriated tools did not exist. The results of the current study showed that AOA represented 78% of the total AO in the environment for the period 2012-13 (AOA  $2.9 \times 10^9 \pm 2.1$  gene copies g SPM<sup>-1</sup>), with comparable numbers of AOB ( $10^6$  to  $10^8$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> in 2002-03,  $8.0 \times 10^8 \pm 6.7$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> in 2012-13). This similarity in abundance of AOB is also found in the WWTP outlets ( $10^9$  to  $10^{10}$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> in 2002-03,  $1.8 \times 10^{10} \pm 1.3$  gene copies g SPM<sup>-1</sup> in 2012-13). Changes in the WWTP had little influence on the total numbers of AOB released from the plant, whereas no previous information exists regarding the numbers of AOA, dominating the ammonia oxidizing community.

Despite their abundance, nitrite oxidizers exhibit low *in situ* nitrite oxidation rates, similar to ammonia oxidation rates (Raimonet et al., In preparation). This discrepancy might be due to the fact that NOB, both *Nitrobacter* spp and *Nitrospira* spp, are more sensitive to environmental pressures than AO (Bae et al., 2001, Gieseke et al., 2003, Ruiz et al., 2003, Anthonisen et al., 1976, Wang and Yang, 2004, Kim et al., 2006). However, in the Seine River temperature, oxygen and ammonia concentrations are unlikely to inhibit nitrite oxidation as described in the previously cited studies. Conversely, the pH of around 8 measured throughout the year in the Seine River (Table 9) might be unfavorable for nitrite oxidizers though, preventing optimal nitrite oxidation (Bae et al., 2001, Ruiz et al., 2003). Also, as has been shown by Raimonet et al. (In revision), the concentration of nitrite is an important factor, as the  $K_M$  is high for nitrite oxidising activity (492  $\mu\text{M}$ ), resulting in low affinity. Despite the presence of nitrite in concentrations higher than the DCE norm, the concentrations observed in the Seine River are too low for an efficient nitrite oxidation.

Table 8 - Comparison of nitrifying abundance obtained in the current study with those from previous studies. Numbers of nitrifiers were expressed in copies g.SPM<sup>-1</sup>, copies L<sup>-1</sup> or copies ng DNA<sup>-1</sup> depending on the available data in previous studies for comparison

	copy numbers	unit	target organisms	Environment	Reference	This study
AO (amoA)	10 <sup>6</sup> to 10 <sup>9</sup>	g of dry SPM	AOB	environmental water	this study	-
	10 <sup>8</sup> to 10 <sup>9</sup>	g of dry SPM	AOA			-
	10 <sup>9</sup> to 10 <sup>11</sup>	g of dry SPM	AOB	WWTP outlet		-
	10 <sup>8</sup> to 10 <sup>10</sup>	g of dry SPM	AOA			-
	10 <sup>6</sup> to 10 <sup>8</sup>	g of dry SPM	AOB	environmental water	Cebon et al. 2004	10 <sup>6</sup> to 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>9</sup> to 10 <sup>10</sup>	g of dry SPM	AOB	WWTP outlet		10 <sup>8</sup> to 10 <sup>10</sup>
	10 <sup>3</sup> to 10 <sup>5</sup>	g of dry SPM	AOB	WWTP nitrification reactor	Jin et al. 2010	10 <sup>1</sup> tp 10 <sup>3</sup>
	10 <sup>4</sup> to 10 <sup>7</sup>	ng of nucleic acid	AOB	environmental water	Sonthiphand et al. 2013	10 <sup>1</sup> tp 10 <sup>3</sup>
	10 <sup>3</sup> to 10 <sup>4</sup>	ng of nucleic acid	AOA			10 <sup>2</sup> to 10 <sup>4</sup>
	10 <sup>6</sup>	g of dry soil	AO	soil	Yu et al. 2014	10 <sup>7</sup> to 10 <sup>9</sup>
NO (16S rDNA)	10 <sup>9</sup> to 10 <sup>10</sup>	g of dry SPM	Nitrobacter	environmental water	this study	-
	10 <sup>7</sup> to 10 <sup>9</sup>	g of dry SPM	Nitrospira			-
	10 <sup>9</sup> to 10 <sup>11</sup>	g of dry SPM	Nitrobacter	WWTP outlet		-
	10 <sup>9</sup> to 10 <sup>11</sup>	g of dry SPM	Nitrospira			-
	10 <sup>7</sup> to 10 <sup>9</sup>	g of dry SPM	Nitrobacter	environmental water	Cebon et al. 2005	10 <sup>10</sup> to 10 <sup>11</sup>
	10 <sup>5</sup> to 10 <sup>9</sup>	g of dry SPM	Nitrospira			10 <sup>6</sup> to 10 <sup>9</sup>
	10 <sup>10</sup>	g of dry SPM	Nitrobacter	WWTP outlet		10 <sup>11</sup> to 10 <sup>12</sup>
	10 <sup>10</sup>	g of dry SPM	Nitrospira			10 <sup>10</sup> to 10 <sup>11</sup>
	10 <sup>12</sup>	Liter of sample	Nitrobacter	WWTP sludge reactor	Huang et al. 2010	10 <sup>9</sup> to 10 <sup>10</sup>
	10 <sup>12</sup>	Liter of sample	Nitrospira			10 <sup>8</sup>
	10 <sup>9</sup> to 10 <sup>10</sup>	Liter of sample	Nitrospira	WWTP sludge reactor	Dionisi et al. 2003	10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup> to 10 <sup>6</sup>	g of dry soil	NO	soil	Yu et al. 2014	10 <sup>10</sup> to 10 <sup>11</sup>

Another explanation for the discrepancy between presence of NOB and low NOB activity might be that these organisms are not only implicated in nitrite oxidation. *Nitrobacter* spp has been shown to grow mixotrophically (Steinmuller and Bock, 1976), *i.e.* using organic matter in addition to nitrite oxidation. Mixotrophic growth of *Nitrobacter* spp has for example been observed under aerobic conditions in WWTPs in the presence of acetate (Winkler et al., 2012), explaining high numbers of NOB with high potential activity but low actual nitrite oxidizing activity. In the Seine River water, high suspended particulate matter (SPM), high carbon contents of SPM (8-12%) and dissolved organic carbon (3-5 mgC L<sup>-1</sup>) downstream SAV WWTP (Table 9) could sustain such a mixotrophic activity by *Nitrobacter* spp (Steinmuller and Bock, 1976). Overall only a limited number of studies have investigated mixotrophic and organotrophic growth of nitrite oxidizer and have focused on two pure cultures of *Nitrobacter* spp (*e.g.* Bock et al 1983). Whereas *Nitrobacter winogradskyi* appears to prefer nitrite oxidation over organotrophic growth (Bock, 1976, Delwiche and Finstein, 1965, Ida and Alexandre.M, 1965), *Nitrobacter hamburgensis* has higher mixotrophic and organotrophic than lithoautotrophic growth rates (Starkenbourg et al., 2008, Bock et al., 1983). The use of synthetic medium instead of Seine River water increased nitrite oxidation by a factor 2 (Figure 41), indicating sub optimal conditions for nitrite oxidation in the river. Overall our data suggest that the abundant NOB are only partially active in nitrite oxidation in

the Seine River and this lower activity may be related to the presence of high concentrations of dissolved organic carbon in the water column ( $5.4 \pm 5.1 \text{ mgC L}^{-1}$ ) or the presence of inhibiting agents (*e.g.* antibiotics, heavy metals) and even low substrate concentrations. Future studies will be required to precisely determine whether mixotrophic metabolism or an inhibition of NOB's activity is responsible for diminished nitrite oxidation rates.

The dominance of *Nitrospira* spp in the WWTP outlets as observed in our study is consistent with the results from other studies (Burrell et al., 1998, Cébron and Garnier, 2005, Schramm et al., 1998, Daims et al., 2001). This dominance of *Nitrospira* spp in the WWTP effluents appears to be related to the fact that they are more resistant to high ammonia concentrations than *Nitrobacter* spp (Cabezas et al., 2009). High ammonia concentrations (up to  $1172.0 \text{ } \mu\text{M NH}_4^+$ ) were present in the WWTP outlets, even higher in the WWTP reaction basins, most likely explaining the dominance of *Nitrospira* in the WWTP outlets.

Whereas previously *Nitrospira* spp was also present at high numbers in the Seine River (Cébron and Garnier 2005), in our study *Nitrobacter* spp dominated in the river water column. The change in WWTP operation led to a decrease in ammonium and an increase in nitrite, which could have negatively influenced the presence of *Nitrospira* spp, inhibited by nitrite at  $14.0\text{-}28.0 \text{ } \mu\text{M}$  (Bock and H.-P., 1992). However, the abundance of *Nitrospira* spp in the SAV WWTP effluents has not changed. The overall dominance and presence of *Nitrobacter* spp in the Seine River (already upstream of Paris, unpublished results) most likely originates from soil runoff of a Seine basin dominated by N rich agricultural soils as was shown by Attard et al. (2010) and Cébron and Garnier (2005).

The dominance of AOA over AOB observed in the river (Figure 37) is in line with previous studies showing high abundance of AOA in the water column (Sonthiphand et al., 2013). AOA are known to have lower growth rates than AOB (French et al., 2012), and are abundant in low substrate environments. This explains the relative high contribution of AOA at Asnières (70% contribution AOA to total AO), upstream of the SAV WWTP and relatively low  $\text{NH}_4^+$  concentrations (on average  $7.9 \text{ } \mu\text{M NH}_4^+ \pm 6.6$ , Table 9). Similar to *Nitrobacter* spp, the AOA most likely originate from soil runoff where AOA generally dominate (Yu et al., 2014), and have the capacity to use organic carbon molecules (Tourna et al., 2011). Furthermore, the relative high abundance of AOA upstream Paris can be explained, despite a low growth rates, by a very high affinity of AOA, as shown in *Nitrosopumilus maritimus*, towards ammonia (half saturation constant of  $0.13 \text{ } \mu\text{M NH}_4^+$ ) (Martens-Habbena et al., 2009). The decreased riverine  $\text{NH}_4^+$  concentrations since the improvement of the WWTPs (to on

average  $36.0 \mu\text{M NH}_4^+ \pm 44.0$ ; Table 9) may sustain the dominance of AOA over AOB in the water column. In contrast, AOB were found in greater abundance than AOA in the WWTP outlets (Figure 37), which may be explained by high ammonium concentrations in the WWTP favoring AOB with high growth rates and low affinity for ammonium (Sonthiphand and Limpiyakorn, 2011). This observation is in agreement with other studies, showing a dominance of AOB in sludge from WWTPs (Fitzgerald et al., 2015, Sinthusith et al., 2015).

The presence of high numbers of AOA and *Nitrobacter* spp upstream Paris are to a large extent explained by soil runoff, whereas the influence of WWTP discharge modified the structure of the microbial community releasing AOB and some *Nitrospira* in the water column. Even though the SAV WWTP outlet had an impact on the composition of the nitrifying community, the overall effect of these outlets on the total numbers of Bacteria, Archaea and nitrifiers in the water column of the Seine River is rather low.

Seasonally, total numbers of Bacteria and Archaea showed variations most likely influenced by the river discharge, temperature and substrate concentrations. The relative abundance of the different nitrifying groups was rather stable at Asnières indicating a minor effect of the SAM WWTP despite effluents exhibited much more variation. That is most likely due to the lower discharge of this WWTP in relation to the Seine River flow. Regarding Poissy, the impact of SAV was shown to be limited to AOB and *Nitrospira* spp, both groups low in abundance in the Seine River. As a consequence, variations in abundances cannot be fully explained by those of SAV WWTP which did not vary systematically in concomitance due the changing ratio of the effluent discharges and the river flow. However, the relation observed between  $\text{NO}_2^-$  and the two dominant nitrifying groups in the Seine River (AOA and *Nitrobacter*) may be an important factor in the seasonal variations. This correlation and the difference observed between nitrite oxidation in the Seine River water compared to synthetic medium indicate that other (inhibiting, limiting) factors present in the Seine River may be the determining factors of the low nitrite oxidation rates.

## V. Conclusions

We investigated for the first time the different groups of the nitrifying populations of the Seine River and we determined the changes related to a nitrogen treatment in the two largest WWTPs of the Paris agglomeration. The abundance of the nitrifying communities was increased by a factor 10 compared to prior the N treatment in the 2000's, most likely the contribution of the AOAs (Cébron et al., 2004; Cébron and Garnier, 2005). Whereas AOB dominated in the WWTP effluents, AOA, adapted to lower amount of substrates, were more abundant than AOB in the river water. Regarding the NOB, *Nitrospira* dominated over *Nitrobacter* spp in the WWTP effluents, whereas *Nitrospira* spp released in the river via the effluents quickly disappeared downstream. Data obtained in the sediment (unpublished) would seem to indicate that *Nitrospira* spp are more susceptible to aggregate rapidly. Their abundance increased by a factor 10.000 in the sediment downstream of the SAV WWTP when compared to upstream, whereas the other nitrifying groups only increased 10 to 100 times. However the fast growing *Nitrobacter* spp, abundant in the riverine environment did not efficiently reduce the nitrite brought by the WWTP effluents. As a consequence nitrite concentrations exceed the limit fixed by the European directive (0.7  $\mu\text{M}$ ) and contribute to the decrease of the water quality in this area, despite the successful reduction of ammonia concentrations. Seasonal variability, inherent to this type of environmental study, did not contradict these observations. The persistence of nitrite in the Seine River appears to be linked to the NOB community. On one hand, *Nitrospira* issued from the WWTP effluents is not adapted to the new conditions of the environment, and on the other hand, the mixotrophic *Nitrobacter* spp may adapt to the new conditions of the Seine, shifting from autotrophy to heterotrophy in the presence of organic carbon in the Seine River. However, DOC variations have no correlation with the abundance of *Nitrobacter* spp, whereas  $\text{NO}_2^-$  showed a strong correlation. This indicates that possible reasons of the low nitrite oxidation efficiency may be the presence of inhibitors in the Seine River water, a shift from autotrophy to mixotrophy, a limitation by the substrates in regard to high  $K_m$ . It is probable that the reasons listed are all true, and they each play a role with varying degree in the low efficiency of nitrite oxidation.



## Acknowledgements

The authors thank Eva Spieck for providing the DNA of three of the NOB genera (*Nitrospira*, *Nitrospina* and *Nitrotoga*), Franck Poly for providing the DNA of *Nitrobacter hamburgensis*, and Sylvie Collin for providing the DNA of *Nitrososphaera viennensis*. We also thank the «Syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne» for providing the water samples and data on the Seine River and its WWTPs. This work was supported by the 'Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine' (PIREN Seine).

## References

- Aissa-Grouz, N., Garnier, J., Billen, G., Mercier, B. and Martinez, A. (2015) 'The response of river nitrification to changes in wastewater treatment (The case of the lower Seine River downstream from Paris)', *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology*, 51(4), pp. 351-364.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. and Srinath, E. G. (1976) 'Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous-acid', *Journal Water Pollution Control Federation*, 48(5), pp. 835-852.
- Attard, E., Poly, F., Commeaux, C., Laurent, F., Terada, A., Smets, B. F., Recous, S. and Le Roux, X. (2010) 'Shifts between *Nitrospira*- and *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices', *Environmental Microbiology*, 12(2), pp. 315-326.
- Bae, W., Baek, S., Chung, J. and Lee, Y. (2001) 'Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors', *Biodegradation*, 12(5), pp. 359-366.
- Bock, E. (1976) 'Growth of *Nitrobacter* in presence of organic matter .2. Chemo-organotrophic growth of *Nitrobacter agilis*', *Archives of Microbiology*, 108(3), pp. 305-312.
- Bock, E. and H.-P., K. 1992. The genus *Nitrobacter* and related genera. *The Prokaryotes*, second Ed.: Springer.
- Bock, E., Sundermeyerklinger, H. and Stackebrandt, E. (1983) 'New facultative lithoautotrophic Nitrite-Oxidizing bacteria', *Archives of Microbiology*, 136(4), pp. 281-284.
- Burrell, P. C., Keller, J. and Blackall, L. L. (1998) 'Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), pp. 1878-1883.
- Cabezas, A., Draper, P. and Etchebehere, C. (2009) 'Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), pp. 1191-1202.
- Coolen, M. J. L., Abbas, B., van Bleijswijk, J., Hopmans, E. C., Kuypers, M. M. M., Wakeham, S. G. and Damste, J. S. S. (2007) 'Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids', *Environmental Microbiology*, 9(4), pp. 1001-1016.

Cébron, A., Berthe, T. and Garnier, J. (2003) 'Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France)', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp. 7091-7100.

Cébron, A., Coci, M., Garnier, J. and Laanbroek, H. J. (2004) 'Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: Impact of Paris wastewater effluents', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), pp. 6726-6737.

Cébron, A. and Garnier, J. (2005) 'Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France)', *Water Research*, 39(20), pp. 4979-4992.

Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H. and Wagner, M. (2001) 'In situ characterization of Nitrospira-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), pp. 5273-5284.

Delwiche, C. C. and Finstein, M. S. (1965) 'Carbon and energy sources for nitrifying autotroph Nitrobacter', *Journal of Bacteriology*, 90(1), pp. 102-&.

Fitzgerald, C. M., Camejo, P., Oshlag, J. Z. and Noguera, D. R. (2015) 'Ammonia-oxidizing microbial communities in reactors with efficient nitrification at low-dissolved oxygen', *Water research*, 70, pp. 38-51.

Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E. and Oakley, B. B. (2005) 'Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp. 14683-14688.

French, E., Kozlowski, J. A., Mukherjee, M., Bullerjahn, G. and Bollmann, A. (2012) 'Ecophysiological Characterization of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria from Freshwater', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), pp. 5773-5780.

Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R. and Vorosmarty, C. J. (2004) 'Nitrogen cycles: past, present, and future', *Biogeochemistry*, 70(2), pp. 153-226.

Garnier, J., Billen, G. and Cébron, A. (2007) 'Modelling nitrogen transformations in the lower Seine river and estuary (France): impact of wastewater release on oxygenation and N<sub>2</sub>O emission', *Hydrobiologia*, 588, pp. 291-302.

Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M. and Amann, R. (2003) 'Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm', *Environmental Microbiology*, 5(5), pp. 355-369.

Graham, D. W., Knapp, C. W., Van Vleck, E. S., Bloor, K., Lane, T. B. and Graham, C. E. (2007) 'Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification', *Isme Journal*, 1(5), pp. 385-393.

Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L. and Lin, S. (2010) 'Serious Overestimation in Quantitative PCR by Circular (Supercoiled) Plasmid Standard: Microalgal *pcna* as the Model Gene', *Plos One*, 5(3).

House, W. A. and Warwick, M. S. (1998) 'Intensive measurements of nutrient dynamics in the River Swale', *Science of the Total Environment*, 210(1-6), pp. 111-137.

Ida, S. and Alexandre, M. (1965) 'Permeability of *Nitrobacter agilis* to organic compounds', *Journal of Bacteriology*, 90(1), pp. 151-&.

Jensen, F. B. (2003) 'Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals', *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 135(1), pp. 9-24.

Jin, T., Zhang, T. and Yan, Q. (2010) 'Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), pp. 1167-1176.

Kelso, B. H. L., Smith, R. V. and Laughlin, R. J. (1999) 'Effects of carbon substrates on nitrite accumulation in freshwater sediments', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), pp. 61-66.

Kelso, B. H. L., Smith, R. V., Laughlin, R. J. and Lennox, S. D. (1997) 'Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), pp. 4679-4685.

Kim, D. J., Lee, D. I. and Keller, J. (2006) 'Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH', *Bioresource Technology*, 97(3), pp. 459-468.

Kowalchuk, G. A. and Stephen, J. R. (2001) 'Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology', *Annual Review of Microbiology*, 55, pp. 485-529.

Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. and Schleper, C. (2006) 'Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils', *Nature*, 442(7104), pp. 806-809.

Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, J. R. and Stahl, D. A. (2009) 'Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria', *Nature*, 461(7266), pp. 976-U234.

Merseburger, G., Marti, E., Sabater, F. and Ortiz, J. D. (2011) 'Point-source effects on N and P uptake in a forested and an agricultural Mediterranean streams', *Science of the Total Environment*, 409(5), pp. 957-967.

Mulholland, P. J., Tank, J. L., Sanzone, D. M., Wollheim, W. M., Peterson, B. J., Webster, J. R. and Meyer, J. L. (2000) 'Nitrogen cycling in a forest stream determined by a N-15 tracer addition', *Ecological Monographs*, 70(3), pp. 471-493.

Munz, G., Lubello, C. and Oleszkiewicz, J. A. (2011) 'Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria', *Chemosphere*, 83(5), pp. 720-725.

Raimonet, M., Cazier, T., Rocher, V. and Laverman, A. M. In preparation. Nitrifying Kinetics and the Persistence of Nitrite in Human-Impacted Riverine Waters.

Raimonet, M., Vilmin, L., Flipo, N., Rocher, V. and Laverman, A. M. (2015) 'Modelling the fate of nitrite in an urbanized river using experimentally obtained nitrifier growth parameters', *Water research*, 73, pp. 373-87.

Rocher, V., Paffoni, C., Goncalves, A., Azimi, S. and Pauss, A. (2012a) 'Municipal wastewater treatment by biofiltration: comparisons of various treatment layouts. Part 2: assessment of the operating costs in optimal conditions', *Water Science and Technology*, 65(9), pp. 1713-1719.

Rocher, V., Paffoni, C., Goncalves, A., Guerin, S., Azimi, S., Gasperi, J., Moilleron, R. and Pauss, A. (2012b) 'Municipal wastewater treatment by biofiltration: comparisons of various treatment layouts. Part 1: assessment of carbon and nitrogen removal', *Water Science and Technology*, 65(9), pp. 1705-1712.

Rodier 1984. L'analyse de l'eau 8ème éd. 8ème ed. Paris: Bordas.

Ruiz, G., Jeison, D. and Chamy, R. (2003) 'Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration', *Water Research*, 37(6), pp. 1371-1377.

Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M. and Amann, R. (1998) 'Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), pp. 3480-3485.

Sinthusith, N., Terada, A., Hahn, M., Noophan, P., Munakata-Marr, J. and Figueroa, L. A. (2015) 'Identification and quantification of bacteria and archaea responsible for ammonia oxidation in different activated sludge of full-scale wastewater treatment plants', *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 50(2), pp. 169-175.

Smorczewski, W. T. and Schmidt, E. L. (1991) 'Numbers, activities, and diversity of autotrophic Ammonia-Oxidizing bacteria in a fresh-water, eutrophic lake sediment', *Canadian Journal of Microbiology*, 37(11), pp. 828-833.

Son, J. H. and Carlson, K. H. (2012) 'Will stringent total nitrogen wastewater treatment plant discharge regulations achieve stream water quality goals?', *Journal of Environmental Monitoring*, 14(11), pp. 2921-2928.

Sonthiphand, P., Cejudo, E., Schiff, S. L. and Neufeld, J. D. (2013) 'Wastewater Effluent Impacts Ammonia-Oxidizing Prokaryotes of the Grand River, Canada', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), pp. 7454-7465.

Sonthiphand, P. and Limpiyakorn, T. (2011) 'Change in ammonia-oxidizing Prokaryotes in enriched nitrifying activated sludge', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), pp. 843-853.

Spieck, E. and Lipski, A. (2011) 'Cultivation, growth physiology, and chemotaxonomy of nitrite-oxidizing Bacteria', *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes*, Vol 486, Part A, 486, pp. 109-130.

Starkenbourg, S. R., Arp, D. J. and Bottomley, P. J. (2008) 'D-lactate metabolism and the obligate requirement for CO<sub>2</sub> during growth on nitrite by the facultative lithoautotroph *Nitrobacter hamburgensis*', *Microbiology-Sgm*, 154, pp. 2473-2481.

Steinmuller, W. and Bock, E. (1976) 'Growth of *Nitrobacter* in presence of organic matter .1. Mixotrophic growth', *Archives of Microbiology*, 108(3), pp. 299-304.

Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Koenneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schlöter, M., Wagner, M., Richter, A. and Schleper, C. (2011) 'Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), pp. 8420-8425.

Wang, J. L. and Yang, N. (2004) 'Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions', *Process Biochemistry*, 39(10), pp. 1223-1229.

Winkler, M. K. H., Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Sorokin, D. Y. and van Loosdrecht, M. C. M. (2012) 'Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6), pp. 1657-1666.

Yu, B. B., Wang, X., Yu, S., Li, Q. and Zhou, Q. X. (2014) 'Effects of roxithromycin on ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in the rhizosphere of wheat', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), pp. 263-272.

# Nitrite oxidizers dominate nitrifiers in the water column of the Seine River, France

Thibaut Cazier<sup>1\*</sup>, Mélanie Raimonet<sup>1,2</sup>, Vincent Rocher<sup>3</sup>, Céline Roose-Amsaleg<sup>1</sup>, Josette Garnier<sup>1</sup>, Anniet M. Laverman<sup>1,4\*</sup>

## Supplementary Information

### VI. Material and methods

#### VI.1. Comparison qPCR 16S versus NxrA *Nitrobacter*

A comparison of qPCR results for *Nitrobacter* using either *16S rDNA* or *NxrA* gene amplification was performed on all the samples taken from the Seine River and the WWTP outlets. The primers used for the *16S rDNA* amplification were the primer sets Nitro-1198f and Nitro-1423r in addition to the TaqMan probe Nitro-1374Taq (Graham et al., 2007). The qPCR mastermix used was the SensiFast Probe no-Rox MasterMix (Bioline, UK), and the amplification cycle as follow: (20" 95°, 60" 58°) x50. Results were compared to those obtained with the primer set F1 NxrA and R2 NxrA (Wertz et al., 2008).

#### VI.2. Impact of plasmid linearization on qPCR calculus

The impact of circular plasmid used as reference control in qPCR was determined by comparing the quantification of each plasmid in either circular or linearized state. The linearization was obtained by using the EcoR1 enzyme (Promega, USA) following the instructions, which separate the cloned DNA fragment from the plasmid. The plasmid concentrations were adjusted to 10<sup>7</sup> copies before amplification. This experiment was performed on 4 plasmids containing a long fragment of the 16S rDNA gene, and each plasmid was amplified 6 times in its linear and circular configuration. The 16S rDNA genes were amplified from NOB strains: *Nitrobacter hamburgensis* X14, *Nitrospira defluvii* A17, *Nitrospina gracilis* 3/211 and *Nitrotoga arctica* 6680.



### VI.3. Nitrite oxidation in environmental or controlled conditions

To determine the effect of the environmental conditions on nitrite oxidation, nitrite consumption rates were determined in nitrifying medium and in Seine river water. The experiments conducted with Seine River water were done using 120 mL of unmodified water. Determining the nitrite oxidation rates with synthetic medium were done using 120 ml centrifuged Seine river water, with the centrifuged biomass being re-suspending nitrifying medium. This medium contained: 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_2$ , 10 mM  $\text{NaCl}$ , 0,2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{KCl}$ , 112 mg/L HEPES, 0,5 mg/L Phenol red, and 1 mL/L of trace element solution. The pH was adjusted to 7.7 with  $\text{NaHCO}_3$  then to 8.0 with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . After sterilisation, 1 mL of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was added for 100mL of medium. Trace element solution was prepared as follow: 4292 mg/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1988 mg/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 81 mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 17 mg/L  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 68 mg/L  $\text{ZnCl}_2$ , 33 mg/L  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 62 mg/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . In order to prevent ammonia oxidation, allylthiourea was added to the both sets of experiments (river water and synthetic medium) with a final concentration of 100 $\mu\text{M}$ , and  $\text{NO}_2^-$  was added with a final concentration of 120  $\mu\text{M}$ . Experiment were conducted in triplicate and the batches were agitated at 150 rpm at room temperature (20°C). Water samples (5 mL) were taken from each batch and filtered (0.22  $\mu\text{m}$  PVDF, Millipore, Germany) every hour between  $t_0$  and  $t_4$ , and a final sample was taken after 17,5 hours.

### VI.4. Results and discussion

An increase in nitrite oxidation rates (2.3 times higher, Fig. SI1) indicates that conditions in the environment aren't compatible with efficient nitrite oxidation. The nitrite oxidation rate is measured at 0.39  $\mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$  in the synthetic medium and 0.17  $\mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$  in the Seine River water (Figure 41). Two factors can be responsible for this difference: inhibition of nitrite oxidizers by pollutants (*e.g.* antibiotics and heavy metal) or a mixotrophic metabolism. Since both dissolved organic carbon and pollutants are absent in the synthetic medium, it is impossible for now to determine the precise reason for the low efficiency of nitrite oxidation in the Seine River.

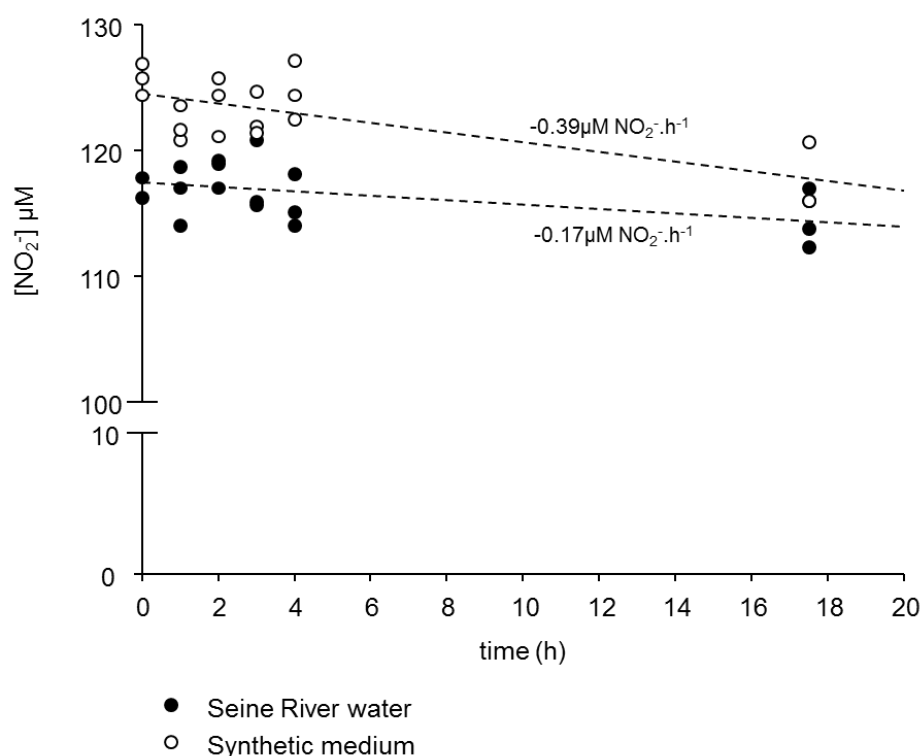


Figure 41 - Comparison between nitrite oxidation rates in Seine River water and in synthetic medium.

The qPCR efficiency is higher for the circular plasmid than the linearized plasmid ( $+2.71 \pm 2.98$ ) despite the fact that a precedent study showed the opposite results ( $-2.68$ - $4.38$ ) (Hou et al., 2010). The difference in vector could be the reason for the differences between the results of Hou et al. (2010) (pBluescript II KS vectors) and our study (pGemt easy vector), as well as the difference in insert length. Hou et al. (2010) observed that the decrease in efficiency augmented with the length of the amplicon from 2.68 for 436 pb to 4.38 for 853 pb. As a consequence, considering that the amplicons for AO are longer than the amplicons for NOB (491 and 629 vs 323 and 151), the overestimation would be higher for the AO than the NOB. This would entail a higher dominance of NOB than observed in the Seine River and the WWTP outlets. The impact of vector choice should be investigated further.

The quantification of *Nitrobacter* by qPCR targeting the specific *16S rDNA* primers for *Nitrobacter* entails a sur-estimation of *Nitrobacter*'s abundance (Figure 42). This is due to the fact that the primer set used (Graham et al., 2007) does target other bacterial groups. As a consequence, the functional gene *NxrA* was used to provide a more precise count, despite the multiple copies of the *NxrA* gene in the *Nitrobacter* genome (2 to 3 copies). But the sur-

estimation was observed to be different in the WWTP outlets (x2.6) than in the Seine River samples (x14.3) (Fig. SI2). This is the consequence of the differences in the microbial communities' structure in those two environments. The sur-estimation factor is then most likely linked to a microbial community, and can't be extrapolated to others. As a consequence, we would advise not to use the primer set Nitro-1198f, Nitro-1423r and Nitro-1374Taq (Graham et al., 2007) as a mean to quantify the *Nitrobacter* genera.

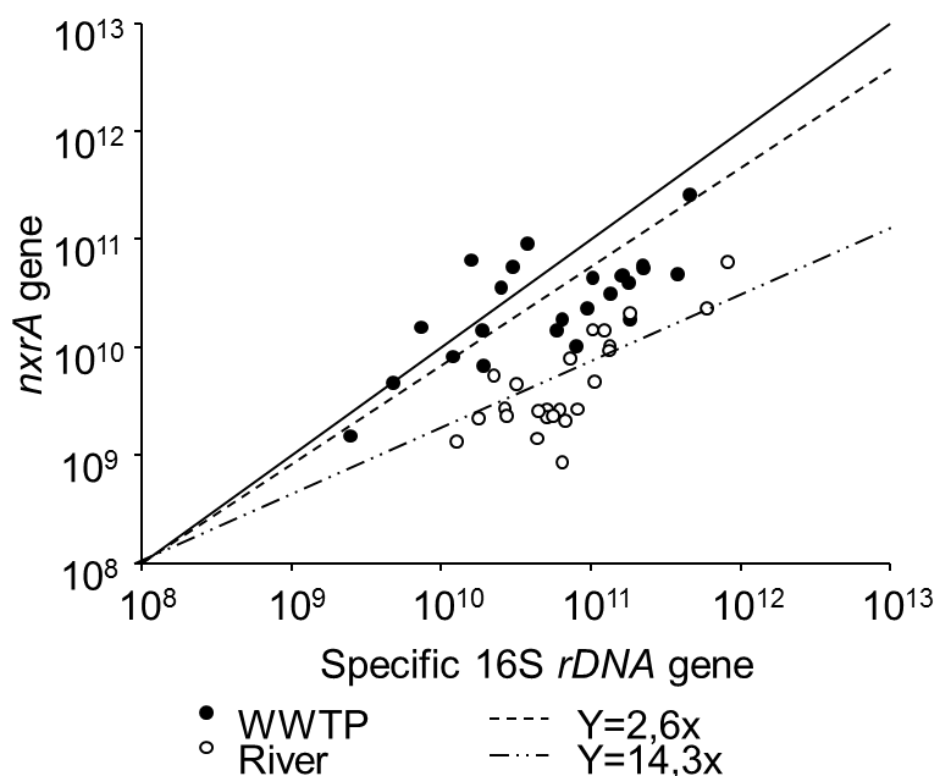


Figure 42 - Comparison of the quantification of *Nitrobacter* using either the 16S *rDNA* gene or the *NxrA* gene in the WWTP outlets and the Seine River water. The plain line represent the equation  $Y=1x$

*Table 9 - Table of the environmental parameters in the Seine River at Asnières and Poissy and in the WWTP effluents for the 12 sampling in each site.*

	Date temporel	flow rates m3/s	NH4 μM	NO2 μM	NO3 μM	SPM mg/L	pH	DOC mg/L
SAM	12/03/2012	4,08	1,67	2,14	1 021,43	4,50	7,60	9,57
	18/04/2012	5,58	2,22	2,86	1 214,29	7,40	7,90	8,88
	24/05/2012	5,02	1,11	1,43	1 157,14	4,10	7,94	9,00
	12/06/2012	4,12	2,22	2,86	1 128,57	5,60		6,76
	03/07/2012	3,95	3,89	5,00	1 171,43	15,80	8,04	7,12
	21/08/2012	2,98	15,00	19,29	1 100,00	5,60	8,10	7,21
	11/09/2012	5,76	17,22	22,14	892,86	36,40		20,46
	16/10/2012	3,68	5,00	6,43	1 257,14	8,60	7,55	13,03
	13/11/2012	4,09	7,22	9,29	1 242,86	7,40	7,44	7,28
	11/12/2012	4,04	5,00	6,43	1 028,57	18,80		6,95
	29/01/2013	6,19	18,57	2,86	1 271,43	10,00		7,22
	26/02/2013	6,45	50,71	17,86	778,57	9,30		8,84
Asnières	12/03/2012	229,00	5,56	2,17	403,23	10,00	8,00	2,50
	18/04/2012	150,00	5,56	1,96	351,61	5,00	8,05	2,39
	24/05/2012	399,00	8,89	5,65	320,97	8,00	7,95	3,29
	12/06/2012	220,00	4,44	6,52	333,87	5,00	7,90	5,90
	03/07/2012	169,00	5,00	6,74	348,39	6,00	7,70	3,09
	21/08/2012	111,00	5,00	1,52	266,13	20,00	7,90	2,43
	11/09/2012	96,00	7,22	5,87	270,97	6,00	8,00	22,73
	16/10/2012	367,00	17,78	7,39	232,26	19,00	8,05	6,80
	13/11/2012	424,00	3,89	4,35	438,71	46,00	8,10	3,62
	11/12/2012	344,00	4,44	2,61	400,00	15,00	8,10	3,92
	29/01/2013	569,00	23,89	2,17	432,26	28,00	8,15	2,90
	26/02/2013	621,00	3,33	1,09	416,13	7,00	8,20	2,21
SAV	12/03/2012	16,49	433,57	301,43	418,57	11,00	7,80	15,94
	18/04/2012	26,44	728,57	115,71	447,86	28,00	7,50	15,10
	24/05/2012	19,39	172,14	130,00	272,14	13,00	7,80	11,40
	12/06/2012	21,22	252,86	130,00	364,29	10,00	7,60	12,88
	03/07/2012	16,91	96,43	42,86	302,14	13,00	7,70	12,93
	21/08/2012	15,34	86,43	87,14	87,14	8,00	7,50	11,32
	11/09/2012	28,23	552,14	57,14	700,00	95,00	7,45	29,94
	16/10/2012	21,06	216,43	374,29	265,71	12,00	7,80	15,50
	13/11/2012	18,07	183,57	233,57	295,00	11,25	8,00	17,51
	11/12/2012	17,94	238,57	277,86	162,14	10,00	7,90	13,36
	29/01/2013	28,89	1 172,86	60,00	464,29	26,00	7,60	21,23
	26/02/2013	20,88	453,57	175,00	729,29	14,00	7,30	14,86
Poissy	12/03/2012	373,15	48,33	10,43	433,87	11,00	7,90	4,02
	18/04/2012	253,70	172,22	20,87	395,16	7,00	7,85	3,54
	24/05/2012	550,00	18,33	14,57	312,90	17,00	7,70	3,74
	12/06/2012	310,19	37,78	15,43	350,00	6,00	7,80	5,57
	03/07/2012	305,56	13,89	11,30	333,87	20,00	7,75	4,47
	21/08/2012	194,44	8,89	10,00	298,39	12,00	7,95	2,70
	11/09/2012	146,30	17,78	12,61	290,32	9,00	7,95	22,10
	16/10/2012	325,93	26,67	21,30	241,94	11,00	7,80	7,17
	13/11/2012	537,04	12,78	8,26	314,52	19,00	7,60	4,48
	11/12/2012	329,63	31,67	21,74	385,48	9,00	7,85	3,56
	29/01/2013	740,74	36,67	10,87	464,52	17,00	8,00	3,63
	26/02/2013	1 018,52	18,33	3,48	422,58	31,00	8,20	3,07

*Table 10 - Table of the qPCR results (mean and standard deviation) for the four studied sites and the 12 sampling dates.*

month	group of microo 10 <sup>9</sup> per g SPM	Seine Amont AVG	SD	Asnières AVG	SD	Seine Aval AVG	SD	Poissy AVG	SD
March 2012	Bacterial 16S rDI	3 136,47	745,92	516,55	174,51	1 042,77	176,89	349,25	179,38
April 2012		923,73	468,57	306,99	144,20	2 049,97	82,73	316,83	230,45
May 2012		1 448,22	549,33	960,77	442,29	3 215,11	1 315,64	1 720,72	557,50
June 2012		3 338,77	396,58	161,94	40,94	2 171,15	799,78	7 279,17	2802,28
July 2012		12 597,76	3 569,71	1 977,25	345,65	2 982,53	1 329,53	1 584,02	507,66
August 2012		2 502,69	156,97	598,27	518,18	1 894,30	204,51	607,08	20,01
September 2012		3 780,22	1 347,11	977,60	247,65	1 918,48	1 370,11	3 382,98	2531,22
October 2012		1 547,97	106,45	183,06	43,42	4 320,99	3 018,12	366,17	74,89
November 2012		2 169,97	753,49	184,58	15,64	7 707,81	3 637,61	404,95	145,17
December 2012		590,10	12,00	118,93	1,30	216,69	3,50	92,90	2,96
January 2013		1 095,88	433,05	517,06	16,50	808,66	152,37	761,96	116,11
February 2013		1 074,57	528,14	906,08	432,54	3 701,37	1 336,99	816,32	241,75
March 2012	Archaeal 16S rDI	1 723,06	560,65	287,81	108,50	819,58	439,80	185,24	82,87
April 2012		359,37	298,32	211,94	33,67	733,13	94,52	221,98	106,76
May 2012		655,21	266,25	369,97	201,09	1 898,77	897,68	854,58	96,66
June 2012		1 287,41	228,29	78,25	22,35	2 182,42	940,25	4 875,93	970,22
July 2012		5 127,41	2 374,72	974,26	341,98	1 612,35	866,40	696,62	174,61
August 2012		827,83	67,51	1 067,78	96,93	1 153,33	116,76	940,74	328,87
September 2012		1 068,06	355,17	366,00	60,14	529,93	265,48	868,21	613,77
October 2012		784,69	55,52	75,06	6,75	3 467,59	2 459,08	177,13	35,62
November 2012		788,69	489,53	77,14	9,85	2 767,16	1 365,83	146,33	17,70
December 2012		184,22	115,05	74,39	9,73	193,40	7,59	74,70	8,98
January 2013		549,78	218,73	173,37	25,34	222,69	63,97	262,68	54,03
February 2013		531,06	314,13	302,87	113,38	839,89	387,80	243,54	95,01
March 2012	amoA AOB	10,85	1,74	0,24	0,01	3,19	0,72	0,30	0,01
April 2012		9,02	1,78	0,27	0,05	10,18	1,23	0,21	0,02
May 2012		6,60	4,36	0,45	0,07	35,49	3,54	1,22	0,11
June 2012		32,90	3,01	0,20	0,00	28,91	4,78	4,09	0,19
July 2012		110,85	5,00	0,96	0,10	36,10	5,58	0,80	0,16
August 2012		14,05	1,19	0,97	0,05	17,13	1,53	3,55	0,77
September 2012		9,17	0,79	0,27	0,04	11,55	1,39	1,35	1,26
October 2012		15,59	2,11	0,14	0,01	24,51	1,77	1,26	0,30
November 2012		18,16	1,83	0,13	0,02	18,62	0,69	0,46	0,03
December 2012		3,19	0,46	0,11	0,03	0,34	0,08	0,12	0,03
January 2013		8,44	0,50	0,24	0,02	4,81	0,66	0,46	0,18
February 2013		5,51	0,07	1,01	0,05	5,16	0,42	0,37	0,07
March 2012	amoA AOA	15,03	0,81	1,29	0,03	3,04	0,13	0,72	0,03
April 2012		4,05	0,10	3,38	0,25	11,60	0,11	1,66	0,04
May 2012		0,79	0,03	2,05	0,02	2,21	0,08	1,86	0,21
June 2012		5,35	0,23	0,96	0,02	2,55	0,03	9,96	0,41
July 2012		10,51	0,12	9,71	0,48	4,49	0,18	2,67	0,03
August 2012		14,72	0,38	7,50	0,30	3,88	0,05	2,35	0,10
September 2012		2,50	0,09	5,54	0,13	0,83	0,72	7,11	1,54
October 2012		3,11	0,01	0,87	0,02	9,75	0,06	1,69	0,06
November 2012		3,92	0,29	1,08	0,02	13,05	1,35	2,54	0,06
December 2012		2,57	0,02	0,67	0,02	0,62	0,04	0,53	0,03
January 2013		1,68	0,10	1,25	0,15	0,79	0,03	1,23	0,02
February 2013		1,00	0,04	1,74	0,12	3,05	0,08	1,58	0,06
March 2012	nrxA Nitrobacte	45,91	38,65	5,51	2,29	15,39	9,59	4,52	3,32
April 2012		10,16	6,64	2,65	0,29	8,21	3,51	2,71	0,41
May 2012		44,34	12,26	8,00	4,31	55,93	34,03	14,53	5,32
June 2012		57,83	10,85	1,43	0,52	35,80	24,61	61,48	27,96
July 2012		258,99	120,34	23,03	9,23	64,69	53,43	14,22	6,18
August 2012		18,05	2,57	4,84	0,45	47,14	3,04	20,49	0,95
September 2012		31,68	14,53	10,13	6,51	14,32	10,04	9,35	8,89
October 2012		40,05	5,93	2,21	1,32	91,23	80,86	2,56	1,27
November 2012		54,12	15,99	2,09	0,76	48,07	23,72	2,68	1,98
December 2012		14,37	3,08	1,33	0,27	1,52	0,09	0,86	0,09
January 2013		22,97	12,40	2,28	0,28	4,70	1,93	2,35	0,59
February 2013		18,24	13,26	2,63	1,43	6,78	6,52	2,32	0,89
March 2012	16S Nitrospira	19,74	6,60	0,10	0,01	19,19	1,57	0,07	0,01
April 2012		61,03	10,87	0,07	0,02	55,49	28,62	0,11	0,02
May 2012		184,28	19,05	0,69	0,06	296,37	43,87	1,50	0,05
June 2012		131,30	26,46	0,09	0,01	177,27	12,76	4,07	0,38
July 2012		486,54	75,46	0,30	0,08	139,10	57,37	0,56	0,12
August 2012		94,88	3,12	0,13	0,03	50,88	5,49	3,29	0,14
September 2012		92,19	5,25	0,11	0,01	103,46	15,83	1,14	0,13
October 2012		92,09	38,45	0,07	0,01	108,78	20,14	1,24	0,15
November 2012		197,14	55,75	0,11	0,01	211,13	24,89	0,22	0,04
December 2012		73,45	10,05	0,15	0,01	3,04	0,90	0,12	0,00
January 2013		111,39	1,60	0,41	0,06	47,45	12,18	0,69	0,08
February 2013		65,97	2,64	1,08	0,06	56,30	21,15	0,98	0,07

Table 11 - Table comparing the qPCR amplification of plasmids in circular and linear form.

	10 <sup>6</sup> Copy number/g dry SPM	
	Circular	Linear
<i>Nitrobacter</i>	10,4	8,9
	9,3	8,4
	9,8	9,6
	10,2	9,3
	9,5	9,1
	10,4	9,3
<i>Nitrospira</i>	12,9	2,6
	11,9	2,5
	8,4	2,5
	7,4	3,0
	21,0	4,7
	5,8	5,3
<i>Nitrospina</i>	12,9	5,0
	10,3	5,0
	9,9	5,4
	8,4	5,3
	9,3	5,2
	10,1	6,5
<i>Nitrotoga</i>	12,4	4,4
	7,3	4,8
	7,8	4,4
	10,7	5,0
	74,0	4,8
	9,3	4,6



## 4 Discussion et perspectives

---





## **I. Discussion : dynamique du nitrite en Seine et Procaryotes associés**

Le nitrite est essentiellement un intermédiaire du processus de nitrification qui domine dans la colonne d'eau oxygénée, et de celui de la dénitrification qui prime dans le sédiment généralement anoxique. Alors que pour la nitrification, deux communautés distinctes de Procaryotes sont impliquées dans les deux étapes, de nitrosation (oxydation de l'ammonium et production de nitrite) et nitratation (oxydation du nitrite et production de nitrate), pour la dénitrification la communauté bactérienne est plus diversifiée et ubiquiste, capable de passer d'une respiration en aérobiose à une respiration en anaérobiose, en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons. L'originalité de cette thèse réside en l'étude simultanée des communautés microbiennes impliquées dans les processus dominants à l'origine du nitrite dans la colonne d'eau et dans les sédiments.

Un objectif secondaire de cette thèse a été d'évaluer l'impact du traitement de l'azote en STEP sur la dynamique du nitrite en Seine. Cette évaluation a reposé sur la comparaison entre la période précédant l'introduction de ces traitements (en 2007) et la période postérieure. L'aspect biogéochimique de cette comparaison est couvert par les travaux de thèse de N. Aissa-Grouz (2015, et Aissa-Grouz et al., 2015), tandis que l'aspect biologique sera couvert par la comparaison des résultats de cette thèse avec ceux de la thèse d'A. Cébron (2004). Cette comparaison a permis d'observer l'efficacité des traitements de l'azote sur les concentrations des différentes formes solubles de l'azote. Avant 2007, les niveaux des différentes formes de l'azote étaient élevés dans la Seine jusqu'à l'estuaire, avec notamment de fortes concentrations en ammonium (Passy et al., 2013). Cet ammonium était oxydé en nitrate le long de la Seine par nitrification, mais le nitrite s'accumulait également, atteignant un pic ( $>40 \mu\text{M NO}_2^-$ ) dans l'estuaire (Aissa-Grouz et al., 2015). Suite à l'ajout des traitements de l'azote par nitrification des eaux usées, les rejets d'ammonium par les STEPs ont diminué, ce qui a conduit à un fort abaissement des taux d'ammonium dans la Seine (Aissa-Grouz et al., 2015). Depuis 2007, le nitrite n'augmente plus le long de la Seine, mais la quantité de nitrite rejeté par les STEP a augmenté, conduisant à un pic de nitrite immédiatement en aval de Paris ( $>20 \mu\text{M NO}_2^-$ ), diminuant progressivement jusqu'à l'estuaire.

Les mesures et les expériences ont, dans la mesure du possible, été effectuées dans les conditions environnementales, en utilisant les eaux brutes de la Seine et des effluents, approche typique en écologie microbienne environnementale.

### **I.1. Dynamique du nitrite dans la Seine**

Un objectif principal de cette thèse était d'expliquer la présence du nitrite dans la Seine en aval immédiat de la station d'épuration de l'agglomération Parisienne et sa persistance sur une grande distance dans la Seine en aval de Paris contribuant à déclasser la masse d'eau correspondante.

Le premier aspect étudié a été l'origine et la dynamique du nitrite, dans la colonne d'eau ainsi que dans le sédiment du secteur de la Seine concerné. Les résultats obtenus semblent montrer qu'entre ces deux compartiments, les différentes étapes du cycle de l'azote sont relativement équilibrées. On observe en effet que la production et la consommation du nitrite se compensent dans les compartiments de la Seine étudiés. Dans la colonne d'eau, les taux d'oxydation du nitrite sont légèrement plus élevés que ceux de l'oxydation de l'ammonium, la différence ( $-0,28 \mu\text{mol NO}_2^-/\text{j/L}$ ) est très faible comparée aux concentrations présentes dans la Seine ( $4$  et  $11 \mu\text{M NO}_2^-$ ) (Figure 43). Il est cependant notable que l'élimination du nitrite est plus rapide en aval de la STEP SAV ( $-0,42 \mu\text{mol NO}_2^-/\text{j/L}$ ) qu'en amont ( $-0,15 \mu\text{mol NO}_2^-/\text{j/L}$ ). Il a été observé qu'en octobre 2013 le sédiment était une source de nitrite pour la colonne d'eau ( $+1200 \mu\text{mole NO}_2^-/\text{j/m}^2$ ) avec une production pour une faible partie en profondeur (2-4 cm) dans les sédiments collectés en amont de la STEP Seine Aval, mais surtout en surface des sédiments en amont et en aval de cette STEP. Cependant, cet efflux de nitrite est très faible en comparaison aux concentrations observées dans la colonne d'eau. En effet, cette production est à mettre en relation avec la hauteur d'eau 4 à 5 m au-dessus du sédiment, conduisant à une augmentation de  $0,24 \mu\text{mole NO}_2^-/\text{j/L}$  à  $0,30 \mu\text{mole NO}_2^-/\text{j/L}$  en aval. La production de nitrite à partir des sédiments compenserait donc en partie son élimination de la colonne d'eau en aval de SAV et la dépasserait en amont.

Cependant ces conclusions résultent de résultats ponctuels obtenus au cours de ces travaux. Il convient de les assortir de deux commentaires essentiels. D'une part, des travaux menés précédemment sur les sédiments de Seine n'ont pas toujours montré une production de nitrite, mais ont mis en évidence une forte variabilité. D'autre part, les sédiments que nous avons utilisés pour mener à bien ces observations ont été naturellement collectés dans des zones de sédimentation au sein du lit de la Seine. Or, ces zones ne couvrent pas la totalité du

lit de la Seine, et l'extrapolation à la section moyenne de la Seine pour comparer les processus liés au sédiment et les processus liés à la colonne d'eau surestiment l'importance des processus liés à la colonne d'eau.

En aval de SAV, le nitrite est éliminé dans la colonne d'eau à raison de  $0,42 \mu\text{mol NO}_2^-/\text{j/L}$  pour une concentration dans la Seine de  $11 \mu\text{M}$ , soit 3,8 % par jour, ce qui correspond temps caractéristique d'élimination de 28 jours. Tenant compte des temps de séjour de l'eau dans la Seine à l'aval de l'agglomération parisienne, il apparaît que le nitrite ne peut que très partiellement être éliminé avant l'arrivée des eaux dans l'estuaire, situé à environ 150 km de la STEP SAV. La nitrification paraît donc avoir un impact négligeable sur la dynamique du nitrite en Seine. Les travaux de Raimonet *et al.* (en préparation) ont cependant montré que malgré un équilibre des taux d'oxydation de l'ammonium et du nitrite *in situ* les taux potentiels d'oxydation du nitrite étaient beaucoup plus important que les taux potentiels d'oxydation de l'ammonium. Il semblerait donc que l'activité *in situ* des oxydants du nitrite calculées à partir des mesures potentielles expérimentales, puisse être plus élevée qu'observée directement dans la Seine, et que ces organismes sont probablement inhibés par des éléments présents dans la Seine, limités par le substrat ou basculent vers un comportement mixotrophe.

Les travaux de thèse de N. Aissa-Grouz (2015) montrent que l'essentiel du nitrite dans la Seine à l'aval de Paris est apporté par les effluents. Les présents travaux de cette thèse ont montré que la dynamique du nitrite dans la colonne d'eau de la Seine est faible, conduisant à la persistance du nitrite en aval de Paris. Les rejets de la STEP Seine Aval semblent cependant avoir une influence qualitative sur la dynamique du nitrite, bien que faible quantitativement.

Cependant, bien que le nitrite soit actuellement déclassant pour la qualité de l'eau à l'aval de Paris, si l'on se place à l'échelle de l'ensemble de la Basse Seine, de Paris à l'estuaire, il apparaît depuis 2007 une amélioration de la qualité de l'eau par rapport à la période précédant l'introduction du traitement de la nitrification dans les STEPs. Les fortes entrées d'azote sous forme d'ammonium conduisaient à une production de nitrite dans la Basse Seine, à l'entrée de l'estuaire à Poses, lors de la nitrification (Garnier et al., 2007) avec des concentrations plus importantes qu'actuellement (Aissa Grouz, 2015). Les taux potentiels d'oxydation de l'ammonium étaient par ailleurs plus élevés que les taux d'oxydation du nitrite avant 2007 (Cébron et al., 2003) ce qui est en accord avec les observations d'accumulation de nitrite dans la colonne d'eau jusqu'à l'estuaire. Les enjeux relatifs au nitrite (toxicité cellulaire pour la majorité des êtres vivants, et toxicité respiratoire pour les organismes complexes)

étaient alors masqués par la désoxygénation engendrée par la réduction de l'ammonium, et critique pour la faune aquatique (Garnier et al., 2001).

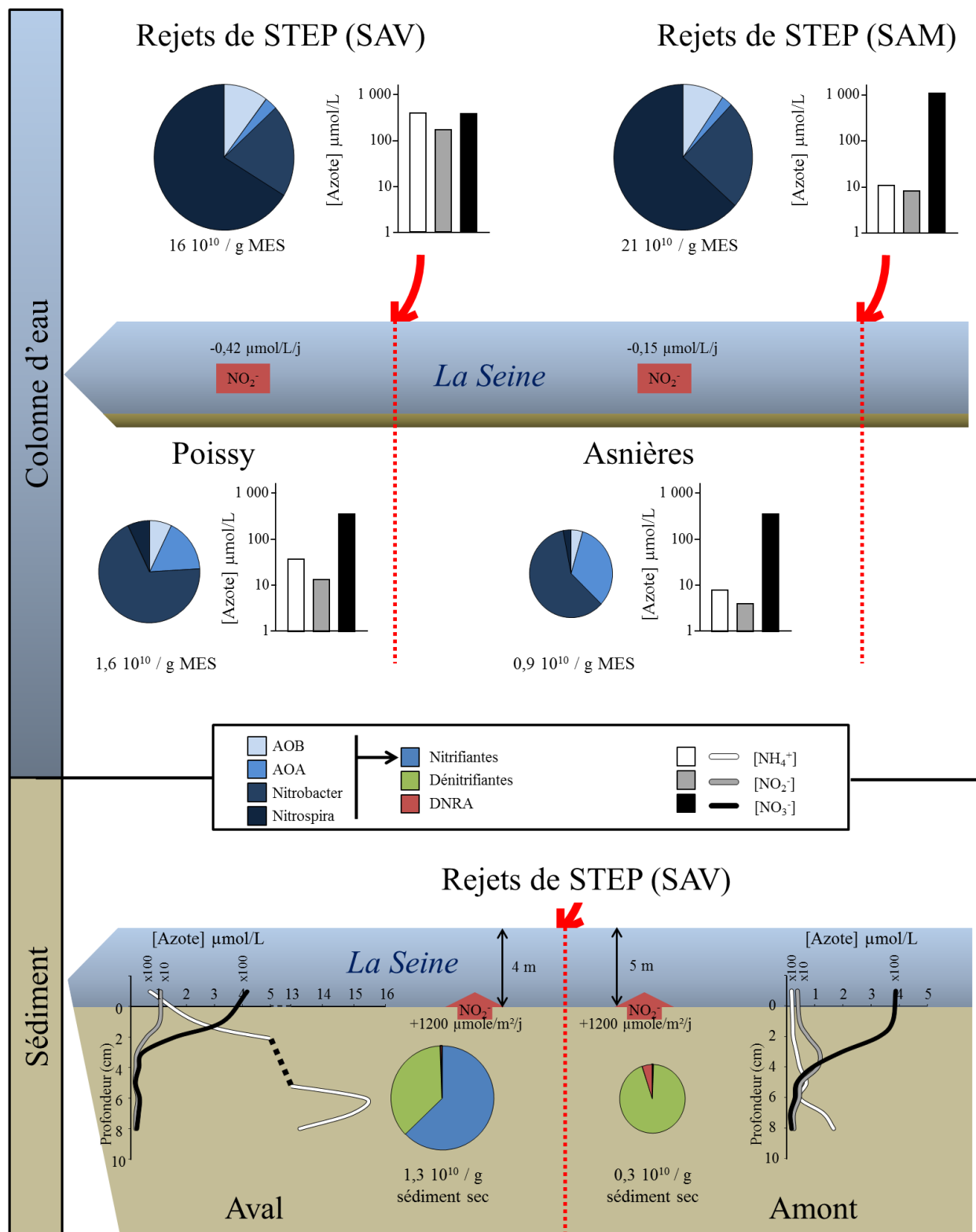


Figure 43 - Influence des STEP de Paris sur les communautés impliquées dans la dynamique du nitrite dans la Seine. Bilan de la colonne d'eau en haut, et du sédiment en bas de la figure.

## I.2. Les communautés de Procaryotes impliquées dans le cycle de l'azote

Un autre objectif de cette thèse a été d'étudier les Procaryotes impliqués dans le processus de nitrification dans la colonne surtout, mais aussi de la dénitrification dans les sédiments.

Dans la colonne d'eau, des taux d'oxydation de l'ammonium et du nitrite assez proches pouvaient suggérer une abondance similaire des communautés oxydatrices de l'ammonium et du nitrite. Or l'indice d'abondance des organismes oxydant le nitrite a été observé en nombre supérieur à celui des organismes oxydant l'ammonium (Figure 43), en amont comme en aval de la principale STEP de l'agglomération parisienne (Seine Aval), et cette différence est également observée dans les rejets de STEPs. Ce résultat est en accord avec les taux potentiels d'oxydation du nitrite et de l'ammonium, les oxydants du nitrite plus abondants conduisant à des taux potentiels plus importants. Les proportions entre les deux communautés diffèrent toutefois dans l'environnement et les STEPs. Les Bactéries dominent les oxydants de l'ammonium et le genre *Nitrospira* domine les oxydants du nitrite dans les rejets de STEP. La situation est différente dans l'environnement, où les Archées dominent les oxydants de l'ammonium et le genre *Nitrobacter* domine les oxydants du nitrite (Figure 43). L'influence des rejets de la STEP Seine Aval est notable sur la structure de l'ensemble des communautés bactériennes de l'environnement, ainsi que celle des Bactéries oxydant l'ammonium. L'influence des rejets de la STEP Seine Aval est cependant limitée sur les communautés nitrifiantes dans la colonne d'eau, dans la mesure où les groupes dominant la nitrification dans la colonne d'eau ne sont pas significativement affectés (structure de la communauté des AOA en abondance des AOA et de *Nitrobacter*).

Dans le sédiment, les Procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote sont en revanche fortement impactés par les rejets de la STEP Seine Aval. La principale différence observée est l'augmentation d'un facteur 5 de l'abondance de ces Procaryotes en aval de la STEP, comparé à l'amont. La deuxième différence concerne la dominance des dénitrifiants (anaérobies) en amont, alors que les nitrifiantes (aérobies) dominent en aval, notamment le genre *Nitrospira* probablement originaires de la STEP Seine Aval. Ces dominances, reliées aux profils de nitrite dans le sédiment, suggère une production de nitrite en profondeur en amont et en surface en aval de la STEP Seine Aval. Il apparaît donc que les rejets de la STEP Seine Aval ont une influence sur les communautés microbiennes du sédiment de la Seine, et

que les Procaryotes issus de la STEP sont présents et potentiellement actifs dans le sédiment. Le site d'étude ne permet cependant pas de déterminer si cette influence s'étend au-delà du panache de la STEP.

Comme pour la production de nitrite, l'influence de Paris et de ses STEP s semble faible sur les Procaryotes dans la colonne d'eau, mais plus importante sur les Procaryotes présents dans le sédiment. Il est cependant notable que les oxydants du nitrite sont plus abondants dans la colonne d'eau pour la période actuelle qu'avant 2007, ce qui est en accord l'augmentation des taux potentiels l'oxydation du nitrite qui dépassent les taux d'oxydation de l'ammonium.

### **I.3.        Fonctionnement écologique du secteur parisien de la Seine : nitrite et pollutions diverses**

Le principal point de cette thèse est centré sur la pollution en nitrite de la Seine en aval de l'agglomération parisienne, qui dépasse le critère de bon état écologique fixé par l'Union Européenne (0,7  $\mu\text{M}$ ). Le nitrite est en effet toxique pour la plupart des formes de vies aquatiques (monocellulaire ou pluricellulaires), et la connaissance de sa dynamique est importante pour mieux gérer les masses d'eau. Si la dynamique du nitrite est gouvernée par les Procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote, nitrification et dénitrification probablement, ces Procaryotes sont eux-mêmes soumis aux pollutions diverses présentes dans l'environnement, et dans ce secteur de la Seine en particulier. Certains polluants historiques, tels que les métaux lourds sont présents depuis l'industrialisation du bassin de la Seine au 17<sup>ème</sup> siècle (Lestel et al., 2007, Le Cloarec et al., 2011, Pons-Branchu et al., 2015), tandis que les polluants organiques complexes (*e.g.* plastiques, antibiotiques, pesticides, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques / HAPs) sont plus récents, encore insuffisamment étudiés, et ont une influence qui est difficile à déterminer sur l'environnement. S'ils sont toxiques dans leur forme originelle, leurs produits de dégradation sont rarement analysés, mais parfois plus toxiques que le produit d'origine (Guo and Chen, 2012). De plus, les synergies entre les différents polluants sont encore mal connues, et la présence de plusieurs polluants en faible concentration pourrait avoir un effet majeur, alors que pris individuellement ils seraient 'inoffensifs'. Enfin, les pollutions d'origine biologique peuvent également avoir un impact sur l'écologie de la Seine. L'eutrophisation notamment perturbe le cycle de l'azote en apportant un excès de matière organique dans le milieu, susceptible de provoquer une accumulation de nitrite lors de sa dégradation (Garcia-Robledo et al., 2013, Gardner and McCarthy, 2009, Kelso et al., 1999).

Ces pollutions diverses dans la Seine ont un impact qui peut varier en fonction des populations microbiennes. Ainsi, les oxydants du nitrite sont plus sensibles aux pressions environnementales que les oxydants de l'ammonium, tandis que la grande variété d'espèces responsables de la dénitrification en fait un groupe fonctionnel naturellement résilient (Griffiths and Philippot, 2013). Il est donc difficile d'évaluer précisément l'impact d'une pollution sur un cycle biogéochimique, et *a fortiori* un écosystème, tant les groupes microbiens impliqués et leur réponse à un stress sont variés. Les Procaryotes sont en retour capables de dégrader des polluants complexes, tels que les HAP (Liu et al., 2010) ou les antibiotiques (Dantas et al., 2008) encore parce qu'ils sont très divers et potentiellement



présents dans tous types d'environnement. Il est ainsi possible que le déséquilibre observé entre abondance et activité des NOB soit causé par les polluants divers présents dans la Seine ainsi que nous l'avons montré dans les parties 3A. et 3C. .

Un autre facteur influençant le fonctionnement écologique d'un organisme ou d'un groupe fonctionnel est sa capacité à changer de métabolisme. La dénitrification est ainsi une voie métabolique accessoire employée par des bactéries hétérotrophes en absence d'oxygène. La nitrification, processus chimiolithoautotrophe, comprend des nitrifiants capables d'adopter un comportement mixotrophe (Lucker et al., 2010, Musmann et al., 2011), utilisant le carbone de la matière organique comme accepteur d'électrons au lieu de l'azote sous forme d'ammonium ou de nitrite. Cette mixotrophie des organismes composant les communautés fonctionnelles de l'environnement implique des interactions entre les cycles biogéochimiques difficiles à appréhender.

L'approche exhaustive d'un cycle biogéochimique (*e.g.* cinétiques des processus de croissance, mortalité, abondances, biomasse, diversité et activités des Procaryotes, inhibiteurs et leurs interactions) sur un site d'étude dans un secteur de la Seine aussi anthropisé que l'agglomération parisienne en tenant compte des variations temporelles demanderait des moyens complémentaires. L'approche utilisée lors de cette thèse permet cependant de formuler des hypothèses sur la dynamique du nitrite dans la Seine ainsi que des facteurs influençant cette dynamique. Les mesures et les expériences ont été effectuées dans les conditions environnementales dans la mesure du possible, en utilisant les eaux brutes de la Seine et des effluents de STEP.

Il a ainsi été possible de comprendre que le nitrite essentiellement apporté par les effluents avec des Procaryotes spécifiques, n'est pas consommé rapidement dans la Seine et persiste dans la colonne d'eau sur plusieurs dizaines de km. Une explication est que les activités nitrosantes (oxydation de l'ammonium) et nitratantes (oxydation du nitrite) sont du même ordre de grandeur, de sorte que la quantité de nitrite produit s'annule avec celle consommée, sans surconsommation du nitrite excédentaire. Alors que les organismes nitratants sont les plus abondants (d'un facteur 1 à 5 par rapport aux nitrosants dans la Seine), une inhibition de ces Procaryotes nitrosants par les polluants pourraient ralentir la consommation de nitrite. Les concentrations de nitrite ne sont de plus pas suffisamment élevées pour permettre de sélectionner les résistances aux polluants présents dans la Seine.

## II. Perspectives

Les travaux effectués lors de cette thèse ont permis de modifier le regard sur le cycle de l'azote dans la Seine, et sur l'importance relative des différents compartiments d'un secteur de rivière, colonne d'eau et sédiment. Ces travaux posent cependant encore de nombreuses questions sur le fonctionnement de la Seine en général, et sur le cycle de l'azote en particulier. Ainsi, lors de cette étude, l'activité ainsi que l'abondance des Procaryotes actifs dans le cycle de l'azote ont été mesurées, mais ces organismes n'ont pas été identifiés. Serait-il possible que l'impact des STEP soit plus important que supposé, si les organismes qui en sont issus persistaient dans l'environnement et remplaçaient les organismes autochtones ? Le caractère source de nitrite du sédiment de la Seine a été décrit en amont comme en aval d'une STEP, mais uniquement pour le mois d'octobre 2013 (Chapitre 2), alors qu'il est décrit comme un puits pour une moyenne de 3 différentes occasions en 2012 (avril et novembre) et 2013 (mai) (Raimonet et al., 2015). Quelles sont les conditions saisonnières pour que le sédiment devienne un puit ou une source de nitrite ? Et les communautés dominant la dynamique du nitrite sont-elles saisonnièrement stables ?

Alors que la majorité de l'étude s'est concentrée sur la colonne d'eau et la nitrification, il est apparu grâce à ces travaux que le sédiment, influencé par les effluents, concentre plus les bactéries, nitrifiantes surtout, sans changement d'activité, et sans que les causes soient complètement identifiées, ce qui nécessite des études complémentaires. Enfin, un autre compartiment de la Seine, la vase fluide, supposée être un compartiment d'intense activité biologique, qui a fait l'objet de travaux préliminaires (en collaboration avec E. Viollier, IPGP) devrait être explorée plus systématiquement malgré les difficultés de prélèvements.

Une étude plus précise du sédiment et de la vase fluide pourrait également être conduite en analysant le rôle des différentes communautés du cycle de l'azote dans la dynamique du nitrite. L'incubation de sédiment en présence d'azote marqué ( $^{15}\text{N}$ , de  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ) suivant la méthode décrite par Holtappels *et al.* (2011) permettrait ainsi de déterminer la voie métabolique responsable du flux de nitrite dans le sédiment ou les particules de vases en condition anoxique (dénitrification, anammox ou DNRA). Une telle expérience sur plusieurs sections d'une carotte permettrait de déterminer les variations en profondeur de la consommation/production de nitrite. L'utilisation de la Reverse Transcriptase-qPCR (RT-qPCR) serait une méthode complémentaire, qui permet de mesurer si les Procaryotes

impliqués dans le cycle de l'azote sont actifs et dans quelles proportions. Cette méthode ne permet cependant pas de tenir compte de l'inactivation ou de l'inhibition des enzymes après leur production.

L'impact des STEPs de l'agglomération parisienne sur le sédiment et la vase fluide pourra être affiné en étendant spatialement les prélèvements. Des prélèvements additionnels le long de l'axe de la Seine permettraient en effet de mieux estimer la portée de l'impact des STEPs, et la relation avec leur panache d'effluents.

De telles campagnes de prélèvements devraient aussi permettre de déterminer si le compartiment de la vase fluide est aussi homogène que la colonne d'eau, ou s'il rend compte de l'hétérogénéité du sédiment. D'une manière générale, ces investigations permettraient également de quantifier l'impact des STEPs sur les compartiments benthiques de la Seine, assez peu étudiés, malgré toutes les études menées depuis le début du PIREN-Seine en 1989. La réalisation temporelle de ces campagnes est de plus nécessaire pour appréhender les variations des conditions hydro-climatiques. Même si la modélisation permet d'établir des bilans à l'interface eau-sédiment, lors de cette thèse, les expériences sur les sédiments n'ont en effet été faites qu'à une seule occasion (en octobre), ne permettant pas à ce stade d'établir un bilan solide des flux de nitrite vers la colonne d'eau.

Enfin, l'étude d'autres facteurs influençant la dynamique du nitrite et des communautés associées est également une voie qui doit continuer d'être explorée. L'effet de la température a commencé à être étudiée, mais de nombreux autres facteurs sont à prendre en compte, tels que la présence d'antibiotiques, de métaux, ou autres polluants. L'étude de la croissance des communautés en milieu contrôlé, par exemple avec une gamme de concentration de polluants et d'azote, permettrait d'approfondir le devenir du nitrite. L'utilisation combinée de plusieurs polluants permettrait aussi de déterminer si leur effet est cumulatif ou non.

Par ailleurs, du point de vue de la caractérisation et quantification des Procaryotes, l'utilisation par exemple de la métagénomique permettrait d'avoir un inventaire « exhaustif » des organismes présents dans un échantillon. Des techniques de quantification plus précises, par exemple la digital PCR (dPCR) (Sykes et al., 1992), permettraient de tenir compte des communautés microbiennes minoritaires qui ont dû être ignorées lors de cette étude car en dessous du seuil de détection (cf. les NOB du genre *Nitrospina*).

## 5 Bibliographie

---



- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. and Polz, M. F. (2004) 'Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons', *Journal of Bacteriology*, 186(9), pp. 2629-2635.
- Aissa Grouz, N. 2015. La qualité des eaux dans le bassin de la Seine. Revisiter les processus après 20 années de progrès majeurs de l'assainissement urbain et industriel. Ph. D thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Aissa-Grouz, N., Garnier, J., Billen, G., Mercier, B. and Martinez, A. (2015) 'The response of river nitrification to changes in wastewater treatment (The case of the lower Seine River downstream from Paris)', *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology*, 51(4), pp. 351-364.
- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Eva Maria, P. and Spieck, E. (2007) 'Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic', *Isme Journal*, 1(3), pp. 256-264.
- Altmann, D., Stief, P., Amann, R. and de Beer, D. (2004) 'Distribution and activity of nitrifying bacteria in natural stream sediment versus laboratory sediment microcosms', *Aquatic Microbial Ecology*, 36(1), pp. 73-81.
- An, S. M. and Gardner, W. S. (2002) 'Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas)', *Marine Ecology Progress Series*, 237, pp. 41-50.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. and Srinath, E. G. (1976) 'Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous-acid', *Journal Water Pollution Control Federation*, 48(5), pp. 835-852.
- Attard, E., Poly, F., Commeaux, C., Laurent, F., Terada, A., Smets, B. F., Recous, S. and Le Roux, X. (2010) 'Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices', *Environmental Microbiology*, 12(2), pp. 315-326.
- Attiwill, P. M. and Adams, M. A. (1993) 'Nutrient cycling in forests', *New Phytologist*, 124(4), pp. 561-582.
- Bae, W., Baek, S., Chung, J. and Lee, Y. (2001) 'Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors', *Biodegradation*, 12(5), pp. 359-366.
- Barak, Y., Tal, Y. and van Rijn, J. (1998) 'Light-mediated nitrite accumulation during denitrification by *Pseudomonas* sp. strain JR12', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), pp. 813-817.
- Barber, L. B., Keefe, S. H., Brown, G. K., Furlong, E. T., Gray, J. L., Kolpin, D. W., Meyer, M. T., Sandstrom, M. W. and Zaugg, S. D. (2013) 'Persistence and Potential Effects of Complex Organic Contaminant Mixtures in Wastewater-Impacted Streams', *Environmental Science & Technology*, 47(5), pp. 2177-2188.
- Bell, T., Newman, J. A., Silverman, B. W., Turner, S. L. and Lilley, A. K. (2005) 'The contribution of species richness and composition to bacterial services', *Nature*, 436(7054), pp. 1157-1160.
- Blackburne, R., Vadivelu, V. M., Yuan, Z. and Keller, J. (2007) 'Kinetic characterisation of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter', *Water Research*, 41(14), pp. 3033-3042.

- Bock, E. (1976) 'Growth of *Nitrobacter* in presence of organic matter .2. Chemo-organotrophic growth of *Nitrobacter agilis*', *Archives of Microbiology*, 108(3), pp. 305-312.
- Bock, E. and H.-P., K. 1992. The genus *Nitrobacter* and related genera. The Prokaryotes, second Ed.: Springer.
- Bock, E., Sundermeyerklinger, H. and Stackebrandt, E. (1983) 'New facultative lithoautotrophic Nitrite-Oxidizing bacteria', *Archives of Microbiology*, 136(4), pp. 281-284.
- Bonin, P. (1996) 'Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from costal marine sediment: A dissimilatory pathway', *Fems Microbiology Ecology*, 19(1), pp. 27-38.
- Both, G. J., Gerards, S. and Laanbroek, H. J. (1992) 'Kinetics of nitrite oxidation in two *Nitrobacter* species grown in nitrite-limited chemostats', *Archives of Microbiology*, 157(5), pp. 436-441.
- Brion, N. and Billen, G. 1998. A reassessment of the  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  incorporation method for measuring autotrophic nitrification and its use to estimate the biomass of nitrifying bacteria. Revue des sciences de l'eau.
- Brion, N., Billen, G., Guezennec, L. and Ficht, A. (2000) 'Distribution of nitrifying activity in the Seine River (France) from Paris to the estuary', *Estuaries*, 23(5), pp. 669-682.
- Broda, E. (1977) '2 kinds of lithotrophs missing in nature', *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*, 17(6), pp. 491-493.
- Brunet, R. C. and GarciaGil, L. J. (1996) 'Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments', *Fems Microbiology Ecology*, 21(2), pp. 131-138.
- Burgin, A. J. and Hamilton, S. K. (2007) 'Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways', *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(2), pp. 89-96.
- Burrell, P. C., Keller, J. and Blackall, L. L. (1998) 'Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), pp. 1878-1883.
- Cabezas, A., Draper, P. and Etchebehere, C. (2009) 'Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), pp. 1191-1202.
- Chesterikoff, A., Garban, B., Billen, G. and Poulin, M. (1992) 'Inorganice nitrogen dynamics in the River Seine downstream of Paris (France)', *Biogeochemistry*, 17(3), pp. 147-164.
- Coolen, M. J. L., Abbas, B., van Bleijswijk, J., Hopmans, E. C., Kuypers, M. M. M., Wakeham, S. G. and Damste, J. S. S. (2007) 'Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids', *Environmental Microbiology*, 9(4), pp. 1001-1016.
- Corriveau, J., van Bochove, E., Savard, M. M., Cluis, D. and Paradis, D. (2010) 'Occurrence of High In-Stream Nitrite Levels in a Temperate Region Agricultural Watershed', *Water Air and Soil Pollution*, 206(1-4), pp. 335-347.

- Cuvilliez, A., Lafite, R., Deloffre, J., Lemoine, M., Langlois, E. and Sakho, I. (2015) 'River flow control on intertidal mudflat sedimentation in the mouth of a macrotidal estuary', *Geomorphology*, 239, pp. 174-181.
- Cébron, A. 2004. Nitrification, bactéries nitrifiantes et émissions de N<sub>2</sub>O. La Seine en aval de Paris. Ph. D thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Cébron, A., Berthe, T. and Garnier, J. (2003) 'Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France)', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp. 7091-7100.
- Cébron, A., Coci, M., Garnier, J. and Laanbroek, H. J. (2004) 'Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: Impact of Paris wastewater effluents', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), pp. 6726-6737.
- Cébron, A. and Garnier, J. (2005) 'Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France)', *Water Research*, 39(20), pp. 4979-4992.
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H. and Wagner, M. (2001) 'In situ characterization of Nitrospira-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), pp. 5273-5284.
- Dantas, G., Sommer, M. O. A., Oluwasegun, R. D. and Church, G. M. (2008) 'Bacteria subsisting on antibiotics', *Science*, 320(5872), pp. 100-103.
- de Liphay, J. R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J. and Sorensen, S. J. (2004) 'Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis', *Soil Biology & Biochemistry*, 36(10), pp. 1607-1614.
- Delwiche, C. C. and Finstein, M. S. (1965) 'Carbon and energy sources for nitrifying autotroph *Nitrobacter*', *Journal of Bacteriology*, 90(1), pp. 102-&.
- Dinh, Q. T., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuil, M. and Labadie, P. (2011) 'Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS', *Talanta*, 85(3), pp. 1238-1245.
- Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. and Sayler, G. S. (2003) 'Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), pp. 6597-6604.
- Drury, B., Rosi-Marshall, E. and Kelly, J. J. (2013) 'Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), pp. 1897-1905.
- European-Council-Directive 2006. Directive 2006/44/EC of the European parliament and of the council of 6 September 2006 on the quality of fresh waters needing protection or improvement in order to support fish life. Official Journal of the European Union.
- Even, S., Poulin, M., Garnier, J., Billen, G., Servais, P., Chesterikoff, A. and Coste, M. (1998) 'River ecosystem modelling: application of the PROSE model to the Seine river (France)', *Hydrobiologia*, 374, pp. 27-45.
- Fitzgerald, C. M., Camejo, P., Oshlag, J. Z. and Noguera, D. R. (2015) 'Ammonia-oxidizing microbial communities in reactors with efficient nitrification at low-dissolved oxygen', *Water research*, 70, pp. 38-51.



- Focht, D.D. and Verstraete, W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification [Soils]. *Advances in Microbial Ecology* 1.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E. and Oakley, B. B. (2005) 'Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp. 14683-14688.
- French, E., Kozlowski, J. A., Mukherjee, M., Bullerjahn, G. and Bollmann, A. (2012) 'Ecophysiological Characterization of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria from Freshwater', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), pp. 5773-5780.
- Fuerst, J. A. (2005) 'Intracellular compartmentation in planctomycetes', *Annual Review of Microbiology Annual Review of Microbiology*. Palo Alto: Annual Reviews, pp. 299-328.
- Gadd, G. M. (2010) 'Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation', *Microbiology-Sgm*, 156, pp. 609-643.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R. and Vorosmarty, C. J. (2004) 'Nitrogen cycles: past, present, and future', *Biogeochemistry*, 70(2), pp. 153-226.
- Garcia-Robledo, E., Revsbech, N. P., Risgaard-Petersen, N. and Corzo, A. (2013) 'Changes in N cycling induced by *Ulva* detritus enrichment of sediments', *Aquatic Microbial Ecology*, 69(2), pp. 113-122.
- Gardner, W. S. and McCarthy, M. J. (2009) 'Nitrogen dynamics at the sediment-water interface in shallow, sub-tropical Florida Bay: why denitrification efficiency may decrease with increased eutrophication', *Biogeochemistry*, 95(2-3), pp. 185-198.
- Garnier, J., Billen, G. and Cébron, A. (2007) 'Modelling nitrogen transformations in the lower Seine river and estuary (France): impact of wastewater release on oxygenation and N<sub>2</sub>O emission', *Hydrobiologia*, 588, pp. 291-302.
- Garnier, J., Cébron, A., Tallec, G., Billen, G., Sebilo, M. and Martinez, A. (2006) 'Nitrogen behaviour and nitrous oxide emission in the tidal Seine River estuary (France) as influenced by human activities in the upstream watershed', *Biogeochemistry*, 77(3), pp. 305-326.
- Garnier, J., Servais, P. and Billen, G. (1992) 'Bacterioplankton in the Seine River (France) - Impact of the Parisian urban effluent', *Canadian Journal of Microbiology*, 38(1), pp. 56-64.
- Garnier, J., Servais, P., Billen, G., Akopian, M. and Brion, N. (2001) 'Lower Seine river and estuary (France) carbon and oxygen budgets during low flow', *Estuaries*, 24(6B), pp. 964-976.
- Garnier, J. A., Mounier, E. M., Laverman, A. M. and Billen, G. F. (2010) 'Potential Denitrification and Nitrous Oxide Production in the Sediments of the Seine River Drainage Network (France)', *Journal of Environmental Quality*, 39(2), pp. 449-459.
- Gerardi, M. H. (2006) *Wastewater Bacteria. WASTEWATER MICROBIOLOGY WILEY-INTERSCIENCE* edn. (5 vols). State College, Pennsylvania: JOHN WILEY & SONS, INC., p. 91-103.

- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M. and Amann, R. (2003) 'Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm', *Environmental Microbiology*, 5(5), pp. 355-369.
- Glass, C. and Silverstein, J. (1998) 'Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation', *Water Research*, 32(3), pp. 831-839.
- Graham, D. W., Knapp, C. W., Van Vleck, E. S., Bloor, K., Lane, T. B. and Graham, C. E. (2007) 'Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification', *Isme Journal*, 1(5), pp. 385-393.
- Gratsepance, J. D., Santoferrara, L. F., McManus, G. B. and Katz, L. A. (2014) 'Diversity of diversity: conceptual and methodological differences in biodiversity estimates of eukaryotic microbes as compared to bacteria', *Trends in Microbiology*, 22(8), pp. 432-437.
- Griffiths, B. S. and Philippot, L. (2013) 'Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community', *Fems Microbiology Reviews*, 37(2), pp. 112-129.
- Guo, R. X. and Chen, J. Q. (2012) 'Phytoplankton toxicity of the antibiotic chlortetracycline and its UV light degradation products', *Chemosphere*, 87(11), pp. 1254-1259.
- Hallam, S. J., Konstantinidis, K. T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y.-i., Sugahara, J., Preston, C., de la Torre, J., Richardson, P. M. and DeLong, E. F. (2006) 'Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), pp. 18296-18301.
- Haller, L., Pote, J., Loizeau, J. L. and Wildi, W. (2009) 'Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland', *Ecological Indicators*, 9(3), pp. 540-547.
- Hanaki, K., Wantawin, C. and Ohgaki, S. (1990) 'Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor', *Water Research*, 24(3), pp. 289-296.
- Hansen, T. J., Tannenbaum, S. R. and Archer, M. C. (1981) 'Identification of a nonenylnitrolic acid in corn treated with nitrous-acid', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(5), pp. 1008-1011.
- Hargreaves, J. A. (1998) 'Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds', *Aquaculture*, 166(3-4), pp. 181-212.
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E. V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H. and Wagner, M. (2008) 'A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), pp. 2134-2139.
- Hedges, J. I. (1992) 'Global biogeochemical cycles - Progress and problems', *Marine Chemistry*, 39(1-3), pp. 67-93.
- Helder, W. and Devries, R. T. P. (1983) 'Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (EMS-Dollard Estuary)', *Netherlands Journal of Sea Research*, 17(1), pp. 1-18.
- Henriksen, K. and Kemp, W. M. 1988. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In: Nitrogen cycling in coastal marine sediments. T. H. Blackburn and J. Sørensen.

- Herbert, R. A. (1999) 'Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems', *Fems Microbiology Reviews*, 23(5), pp. 563-590.
- Hewson, I. and Fuhrman, J. A. (2004) 'Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), pp. 3425-3433.
- Holtappels, M., Lavik, G., Jensen, M. M. and Kuypers, M. M. M. (2011) 'H-15 labeling experiments to dissect the contributions of heterotrophic denitrification and anammox to nitrogen removal in the OMZ waters of the ocean', in Klotz, M.G. (ed.) *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes, Vol 486, Part A Methods in Enzymology*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, pp. 223-251.
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L. and Lin, S. (2010) 'Serious Overestimation in Quantitative PCR by Circular (Supercoiled) Plasmid Standard: Microalgal pcna as the Model Gene', *Plos One*, 5(3).
- House, W. A. and Warwick, M. S. (1998) 'Intensive measurements of nutrient dynamics in the River Swale', *Science of the Total Environment*, 210(1-6), pp. 111-137.
- Huang, Z., Gedalanga, P. B., Asvapathanagul, P. and Olson, B. H. (2010) 'Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor', *Water Research*, 44(15), pp. 4351-4358.
- Hunik, J. H., Meijer, H. J. G. and Tramper, J. (1992) 'Kinetics of Nitrosomonas-europaea at extreme substrate, product and salt concentrations', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(6), pp. 802-807.
- Hunik, J. H., Meijer, H. J. G. and Tramper, J. (1993) 'Kinetics of Nitrobacterèagilis at extreme substrate, product and salt concentrations', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(2-3), pp. 442-448.
- Ida, S. and Alexande.M (1965) 'Permeability of *Nitrobacter agilis* to organic compounds', *Journal of Bacteriology*, 90(1), pp. 151-&.
- Jaffe, P. R. and Ferrara, R. A. (1984) 'Modeling sediment and water column interactions for hydrophoboc pollutants – Parameter discrimination and model response to input uncertainty', *Water Research*, 18(9), pp. 1169-1174.
- Jaranowska, P., Cydzik-Kwiatkowska, A. and Zielinska, M. (2013) 'Configuration of biological wastewater treatment line and influent composition as the main factors driving bacterial community structure of activated sludge', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(7), pp. 1145-1153.
- Jensen, F. B. (2003) 'Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals', *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 135(1), pp. 9-24.
- Jetten, M. S. M., van Niftrik, L., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T. and Op den Camp, H. J. M. (2009) 'Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2-3), pp. 65-84.
- Jimenez, E., Gimenez, J. B., Ruano, M. V., Ferrer, J. and Serralta, J. (2011) 'Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate', *Bioresource Technology*, 102(19), pp. 8741-8747.

- Jin, T., Zhang, T. and Yan, Q. (2010) 'Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), pp. 1167-1176.
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M. and Hallin, S. (2008) 'Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification', *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), pp. 1955-1966.
- Jones, C. M., Welsh, A., Throback, I. N., Dorsch, P., Bakken, L. R. and Hallin, S. (2011) 'Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne N<sub>2</sub>- and N<sub>2</sub>O-producing *Bacillus* isolates harboring the *nosZ* gene', *Fems Microbiology Ecology*, 76(3), pp. 541-552.
- Joye, S.B., Hollibaugh, J.T., 1995. Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science* 270, 623–625.
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., Junier, T., Witzel, K.-P. and Imhoff, J. F. (2010) 'Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), pp. 425-440.
- Kelso, B. H. L., Smith, R. V. and Laughlin, R. J. (1999) 'Effects of carbon substrates on nitrite accumulation in freshwater sediments', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), pp. 61-66.
- Kelso, B. H. L., Smith, R. V., Laughlin, R. J. and Lennox, S. D. (1997) 'Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), pp. 4679-4685.
- Khan, M. W., Naqshbandi, A., Zubair, H., Ahsan, H., Khan, S. A. and Khan, F. H. (2010) 'Nitrite, a Reactive Nitrogen Species, Protects Human Alpha-2-Macroglobulin from Halogenated Oxidant, HOCl', *Protein Journal*, 29(4), pp. 276-282.
- Kim, D. J., Lee, D. I. and Keller, J. (2006) 'Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH', *Bioresource Technology*, 97(3), pp. 459-468.
- Kindle, E. M. (1918) 'Notes on sedimentation in the Mackenzie River basin', *Journal of Geology*, 26(4), pp. 341-360.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M. and Schmidt, T. M. (2000) 'RRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), pp. 1328-1333.
- Kloos, K., Mergel, A., Rosch, C. and Bothe, H. (2001) 'Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria', *Australian Journal of Plant Physiology*, 28(9), pp. 991-998.
- Knowles, G., Downing, A. L. and Barrett, M. J. (1965) 'Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture with aid of electronic computer', *Journal of General Microbiology*, 38(2), pp. 263-&.
- Konopka, A. (2009) 'What is microbial community ecology?', *Isme Journal*, 3(11), pp. 1223-1230.
- Konneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B. and Stahl, D. A. (2005) 'Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon', *Nature*, 437(7058), pp. 543-546.

- Kowalchuk, G. A., Bodelier, P. L. E., Heilig, G. H. J., Stephen, J. R. and Laanbroek, H. J. (1998) 'Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation', *Fems Microbiology Ecology*, 27(4), pp. 339-350.
- Kowalchuk, G. A. and Stephen, J. R. (2001) 'Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology', *Annual Review of Microbiology*, 55, pp. 485-529.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., DeBoer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. and Woldendorp, J. W. (1997) 'Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), pp. 1489-1497.
- Laudelout, H. and Vantichelen, L. (1960) 'Kinetics of the nitrite oxydation by *Nitrobacter-winogradskyi*', *Journal of Bacteriology*, 79(1), pp. 39-42.
- Laverman, A., Cazier, T., Yan, C., Roose-Amsaleg, C., Petit, F., Garnier, J. and Berthe, T. (2015) 'Exposure to vancomycin causes a shift in the microbial community structure without affecting nitrate reduction rates in river sediments', *Environmental Science and Pollution Research*, pp. 1-8.
- Laverman, A. M., Garnier, J. A., Mounier, E. M. and Roose-Amsaleg, C. L. (2010) 'Nitrous oxide production kinetics during nitrate reduction in river sediments', *Water Research*, 44(6), pp. 1753-1764.
- Lavery, P. S., Oldham, C. E. and Ghisalberti, M. (2001) 'The use of Fick's First Law for predicting porewater nutrient fluxes under diffusive conditions', *Hydrological Processes*, 15(13), pp. 2435-2451.
- Lees, H. (1952) 'The biochemistry of the nitrifying organisms .1. The Ammonia-Oxidizing systems of *Nitrosomonas*', *Biochemical Journal*, 52(1), pp. 134-139.
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. and Schleper, C. (2006) 'Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils', *Nature*, 442(7104), pp. 806-809.
- Le Cloarec, M. F., Bonte, P. H., Lestel, L., Lefevre, I. and Ayrault, S. (2011) 'Sedimentary record of metal contamination in the Seine River during the last century', *Physics and Chemistry of the Earth*, 36(12), pp. 515-529.
- Lestel, L., Meybeck, M. and Thevenot, D. R. (2007) 'Metal contamination budget at the river basin scale: an original Flux-Flow Analysis (F2A) for the Seine River', *Hydrology and Earth System Sciences*, 11(6), pp. 1771-1781.
- Li, J., Crowe, S. A., Miklesh, D., Kistner, M., Canfield, D. E. and Katsev, S. (2012) 'Carbon mineralization and oxygen dynamics in sediments with deep oxygen penetration, Lake Superior', *Limnology and Oceanography*, 57(6), pp. 1634-1650.
- Li, Y. H. and Gregory, S. (1974) 'Diffusion of ions in sea-water and in deep-sea sediments', *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 38(5), pp. 703-714.
- Liu, H. J., Yang, C. Y., Tian, Y., Lin, G. H. and Zheng, T. L. (2010) 'Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR-RFLP', *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), pp. 2056-2061.

- Liu, Z. H., Huang, S. B., Sun, G. P., Xu, Z. C. and Xu, M. Y. (2011) 'Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in the Dongjiang River, China', *Microbiological Research*, 166(5), pp. 337-345.
- Lucker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Damste, J. S. S., Spieck, E., Le Paslier, D. and Daims, H. (2010) 'A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), pp. 13479-13484.
- Malcolm, S. J., Battersby, N. S., Stanley, S. O. and Brown, C. M. (1986) 'Organic degradation, sulfate reduction and ammonia production in the sediment of Loch Eil, Scotland', *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 23(5), pp. 689-704.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., Dymock, D. and Wade, W. G. (1998) 'Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA (vol 64, pg 795, 1998)', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), pp. 2333-2333.
- Martens-Habben, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, J. R. and Stahl, D. A. (2009) 'Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria', *Nature*, 461(7266), pp. 976-979.
- Merseburger, G., Marti, E., Sabater, F. and Ortiz, J. D. (2011) 'Point-source effects on N and P uptake in a forested and an agricultural Mediterranean streams', *Science of the Total Environment*, 409(5), pp. 957-967.
- Meybeck, M. (1982) 'Carbon, nitrogen and phosphorus transport by world rivers', *American Journal of Science*, 282(4), pp. 401-450.
- Mohan, S. B., Schmid, M., Jetten, M. and Cole, J. (2004) 'Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification', *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), pp. 433-443.
- Morris, A. W., Howland, R. J. M., Woodward, E. M. S., Bale, A. J. and Mantoura, R. F. C. (1985) 'Nitrite and ammonia in the Tamar estuary', *Netherlands Journal of Sea Research*, 19(3-4), pp. 217-222.
- Mulder, A., Vandegraaf, A. A., Robertson, L. A. and Kuenen, J. G. (1995) 'Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor', *FEMS Microbiology Ecology*, 16(3), pp. 177-183.
- Mulholland, P. J., Tank, J. L., Sanzone, D. M., Wollheim, W. M., Peterson, B. J., Webster, J. R. and Meyer, J. L. (2000) 'Nitrogen cycling in a forest stream determined by a N-15 tracer addition', *Ecological Monographs*, 70(3), pp. 471-493.
- Munz, G., Lubello, C. and Oleszkiewicz, J. A. (2011) 'Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria', *Chemosphere*, 83(5), pp. 720-725.
- Musmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Damste, J. S. S., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Muller, A., Daims, H., Wagner, M. and Head, I. M. (2011) 'Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), pp. 16771-16776.
- Musmann, M., Ribot, M., von Schiller, D., Merbt, S. N., Augspurger, C., Karwautz, C., Winkel, M., Battin, T. J., Marti, E. and Daims, H. (2013) 'Colonization of freshwater

- biofilms by nitrifying bacteria from activated sludge', *Fems Microbiology Ecology*, 85(1), pp. 104-115.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993) 'Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal-RNA', *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), pp. 695-700.
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I., 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* 10, 2966–2978.
- Nielsen, M., Gieseke, A., de Beer, D. and Revsbech, N. P. (2009) 'Nitrate, nitrite, and nitrous oxide transformations in sediments along a salinity gradient in the Weser Estuary', *Aquatic Microbial Ecology*, 55(1), pp. 39-52.
- Nogueira, R. and Melo, L. F. (2006) 'Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors', *Biotechnology and Bioengineering*, 95(1), pp. 169-175.
- Oishi, R., Tada, C., Asano, R., Yamamoto, N., Suyama, Y., Nakai, Y., 2012. Growth of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Cattle Manure Compost under Various Temperatures and Ammonia Concentrations. *Microb Ecol* 63, 787–793.
- Okabe, S., Satoh, H. and Watanabe, Y. (1999) 'In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), pp. 3182-3191.
- Palmer, K., Drake, H. L. and Horn, M. A. (2009) 'Genome-Derived Criteria for Assigning Environmental *narG* and *nosZ* Sequences to Operational Taxonomic Units of Nitrate Reducers', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), pp. 5170-5174.
- Park, S. and Bae, W. (2009) 'Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid', *Process Biochemistry*, 44(6), pp. 631-640.
- Passy, P., Gypens, N., Billen, G., Garnier, J., Thieu, V., Rousseau, V., Callens, J., Parent, J. Y. and Lancelot, C. (2013) 'A-model reconstruction of riverine nutrient fluxes and eutrophication in the Belgian Coastal Zone since 1984', *Journal of Marine Systems*, 128, pp. 106-122.
- Philips, S., Laanbroek, J. H. and Verstraete, W. 2002. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*.
- Pons-Branchu, E., Ayrault, S., Roy-Barman, M., Bordier, L., Borst, W., Branchu, P., Douville, E. and Dumont, E. (2015) 'Three centuries of heavy metal pollution in Paris (France) recorded by urban speleothems', *Science of the Total Environment*, 518, pp. 86-96.
- Prosser, J. I. (1989) 'Autotrophic nitrification in Bacteria', *Advances in Microbial Physiology*, 30, pp. 125-181.
- Prosser, J. I. and Nicol, G. W. (2008) 'Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment', *Environmental Microbiology*, 10(11), pp. 2931-2941.

- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P. and Wagner, M. (2000) 'Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), pp. 5368-5382.
- Raimonet, M., Cazier, T., Rocher, V. and Laverman, A. M. In preparation. Nitrifying Kinetics and the Persistence of Nitrite in Human-Impacted Riverine Waters.
- Raimonet, M., Vilmin, L., Flipo, N., Rocher, V. and Laverman, A. M. (2015) 'Modelling the fate of nitrite in an urbanized river using experimentally obtained nitrifier growth parameters', *Water research*, 73, pp. 373-87.
- Robertson, L. A. and Kuenen, J. G. (1984) 'Aerobic denitrification - a controversy revived', *Archives of Microbiology*, 139(4).
- Rocher, V., Garcia-Gonzalez, E., Paffoni, C. and Thomas, W. 2011. La production de nitrites lors de la dénitrification des eaux usées: un sujet sensible et complexe ! L' Eau, l'industrie, les nuisances.
- Rocher, V., Paffoni, C., Goncalves, A., Azimi, S. and Pauss, A. (2012a) 'Municipal wastewater treatment by biofiltration: comparisons of various treatment layouts. Part 2: assessment of the operating costs in optimal conditions', *Water Science and Technology*, 65(9), pp. 1713-1719.
- Rocher, V., Paffoni, C., Goncalves, A., Guerin, S., Azimi, S., Gasperi, J., Moilleron, R. and Pauss, A. (2012b) 'Municipal wastewater treatment by biofiltration: comparisons of various treatment layouts. Part 1: assessment of carbon and nitrogen removal', *Water Science and Technology*, 65(9), pp. 1705-1712.
- Rockstrom, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Chapin, F. S., Lambin, E., Lenton, T. M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H. J., Nykvist, B., de Wit, C. A., Hughes, T., van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sorlin, S., Snyder, P. K., Costanza, R., Svedin, U., Falkenmark, M., Karlberg, L., Corell, R. W., Fabry, V. J., Hansen, J., Walker, B., Liverman, D., Richardson, K., Crutzen, P. and Foley, J. (2009) 'Planetary Boundaries: Exploring the Safe Operating Space for Humanity', *Ecology and Society*, 14(2), pp. 33.
- Rodier 1984. L'analyse de l'eau 8<sup>ème</sup> éd. 8<sup>ème</sup> ed. Paris: Bordas.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K. M., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A. O., Farmerie, W. G. and Triplett, E. W. (2007) 'Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity', *Isme Journal*, 1(4), pp. 283-290.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. and Liesack, W. (1997) 'The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), pp. 4704-4712.
- Ruiz, G., Jeison, D. and Chamy, R. (2003) 'Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration', *Water Research*, 37(6), pp. 1371-1377.
- Rysgaard, S., Thastum, P., Dalsgaard, T., Christensen, P.B., Sloth, N.P., 1999. Effects of salinity on NH<sub>4</sub><sup>+</sup> adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *Estuaries* 22, 21–30.



- Schloss, P. D. and Handelsman, J. (2005) 'Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), pp. 1501-1506.
- Schluter, A., Szczepanowski, R., Puhler, A. and Top, E. M. (2007) 'Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool', *Fems Microbiology Reviews*, 31(4), pp. 449-477.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. and Strous, M. (2003) 'New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater', *Fems Microbiology Reviews*, 27(4), pp. 481-492.
- Schneider, M. K., Stamm, C. and Fenner, K. (2007) 'Selecting Scenarios to Assess Exposure of Surface Waters to Veterinary Medicines in Europe', *Environ. Sci. Technol.*
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S. and Amann, R. (1999) 'Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), pp. 3690-3696.
- Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M. and Amann, R. (1998) 'Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), pp. 3480-3485.
- Servais, P., Garcia-Armisen, T., George, I. and Billen, G. (2007) 'Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling', *Science of the Total Environment*, 375(1-3), pp. 152-167.
- Servais, P., Garnier, J., Demarteau, N., Brion, N. and Billen, G. (1999) 'Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents', *Water Research*, 33(16), pp. 3521-3531.
- Shen, L. and Chen, Z. X. (2007) 'Critical review of the impact of tortuosity on diffusion', *Chemical Engineering Science*, 62(14), pp. 3748-3755.
- Shen, Q. R., Ran, W. and Cao, Z. H. (2003) 'Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification', *Chemosphere*, 50(6), pp. 747-753.
- Sinthusith, N., Terada, A., Hahn, M., Noophan, P., Munakata-Marr, J. and Figueroa, L. A. (2015) 'Identification and quantification of bacteria and archaea responsible for ammonia oxidation in different activated sludge of full-scale wastewater treatment plants', *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 50(2), pp. 169-175.
- Skinner, F. A. and Walker, N. (1961) 'Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture', *Archiv Fur Mikrobiologie*, 38(4), pp. 339-&.
- Smith, R. V., Burns, L. C., Doyle, R. M., Lennox, S. D., Kelso, B. H. L., Foy, R. H. and Stevens, R. J. (1997a) 'Free ammonia inhibition of nitrification in river sediments leading to nitrite accumulation', *Journal of Environmental Quality*, 26(4), pp. 1049-1055.
- Smith, R. V., Doyle, R. M., Burns, L. C. and Stevens, R. J. (1997b) 'A model for nitrite accumulation in soils', *Soil Biology & Biochemistry*, 29(8), pp. 1241-1247.

- Smorczewski, W. T. and Schmidt, E. L. (1991) 'Numbers, activities, and diversity of autotrophic Ammonia-Oxidizing bacteria in a fresh-water, eutrophic lake sediment', *Canadian Journal of Microbiology*, 37(11), pp. 828-833.
- Son, J. H. and Carlson, K. H. (2012) 'Will stringent total nitrogen wastewater treatment plant discharge regulations achieve stream water quality goals?', *Journal of Environmental Monitoring*, 14(11), pp. 2921-2928.
- Sonthiphand, P., Cejudo, E., Schiff, S. L. and Neufeld, J. D. (2013) 'Wastewater Effluent Impacts Ammonia-Oxidizing Prokaryotes of the Grand River, Canada', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), pp. 7454-7465.
- Sonthiphand, P. and Limpiyakorn, T. (2011) 'Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), pp. 843-853.
- Spieck, E., Ehrich, S., Aamand, J. and Bock, E. (1998) 'Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*', *Archives of Microbiology*, 169(3), pp. 225-230.
- Spieck, E. and Lipski, A. (2011) 'Cultivation, growth physiology, and chemotaxonomy of nitrite-oxidizing Bacteria', *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes, Vol 486, Part A*, 486, pp. 109-130.
- Starkenburg, S. R., Arp, D. J. and Bottomley, P. J. (2008) 'D-lactate metabolism and the obligate requirement for CO<sub>2</sub> during growth on nitrite by the facultative lithoautotroph *Nitrobacter hamburgensis*', *Microbiology-Sgm*, 154, pp. 2473-2481.
- Steinmuller, W. and Bock, E. (1976) 'Growth of *Nitrobacter* in presence of organic matter .1. Mixotrophic growth', *Archives of Microbiology*, 108(3), pp. 299-304.
- Stevens, R. J., Laughlin, R. J. and Malone, J. P. (1998) 'Soil pH affects the processes reducing nitrate to nitrous oxide and di-nitrogen', *Soil Biology & Biochemistry*, 30(8-9), pp. 1119-1126.
- Strauss, E.A., Dodds, W.K., 1997. Influence of Protozoa and Nutrient Availability on Nitrification Rates in Subsurface Sediments. *Microb Ecol* 34, 155–165.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (1999) 'Missing lithotroph identified as new planctomycete', *Nature*, 400(6743), pp. 446-449.
- Strous, M., vanGerven, E., Kuenen, J. G. and Jetten, M. (1997) 'Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6).
- Sundermeyerklinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B. and Bock, E. (1984) 'Membrane-bound nitrite oxydoreductase of *Nitrobacter* - Evidence for a nitrate reductase system', *Archives of Microbiology*, 140(2-3), pp. 153-158.
- Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J. and Morley, A. A. (1992) 'Quantitation of targetts for PCR by use of limiting dilution', *Biotechniques*, 13(3), pp. 444-449.
- Talleg, G., Garnier, J., Billen, G. and Gousailles, M. (2006) 'Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: Effect of oxygenation level', *Water Research*, 40(15), pp. 2972-2980.

- Tappe, W., Laverman, A., Bohland, M., Braster, M., Rittershaus, S., Groeneweg, J. and van Verseveld, H. W. (1999) 'Maintenance energy demand and starvation recovery dynamics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* cultivated in a retentostat with complete biomass retention', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), pp. 2471-2477.
- Thurston, R. V., Russo, R. C. and Vinogradov, G. A. (1981) 'Ammonia toxicity to fishes - effect of pH on the toxicity of the un-ionized ammonia species', *Environmental Science & Technology*, 15(7), pp. 837-840.
- Tourna, M., Freitag, T. E., Nicol, G. W. and Prosser, J. I. (2008) 'Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms', *Environmental Microbiology*, 10(5), pp. 1357-1364.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Koenneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schlöter, M., Wagner, M., Richter, A. and Schleper, C. (2011) 'Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), pp. 8420-8425.
- van Niftrik, L. A., Fuerst, J. A., Damste, J. S. S., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. and Strous, M. (2004) 'The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria', *FEMS Microbiology Letters*, 233(1), pp. 7-13.
- Von der Wiesche, M. and Wetzel, A. (1998) 'Temporal and spatial dynamics of nitrite accumulation in the River Lahn', *Water Research*, 32(5), pp. 1653-1661.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. and Daims, H. (2002) 'Microbial community composition and function in wastewater treatment plants', *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1-4), pp. 665-680.
- Wakelin, S. A., Colloff, M. J. and Kookana, R. S. (2008) 'Effect of wastewater treatment plant effluent on microbial function and community structure in the sediment of a freshwater stream with variable seasonal flow', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), pp. 2659-2668.
- Wang, C. X., Zhu, G. B., Wang, Y., Wang, S. Y. and Yin, C. Q. (2013) 'Nitrous oxide reductase gene (*nosZ*) and N<sub>2</sub>O reduction along the littoral gradient of a eutrophic freshwater lake', *Journal of Environmental Sciences-China*, 25(1), pp. 44-52.
- Wang, J. L. and Yang, N. (2004) 'Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions', *Process Biochemistry*, 39(10), pp. 1223-1229.
- Watson, S. W. (1971) 'Characteristics of 2 marine Nitrite Oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov-gen-nov-sp and *Nitrococcus mobilis* nov-gen-nov-sp', *Archiv Fur Mikrobiologie*, 77(3), pp. 203-&.
- Watson, S. W., Bock, E., Valois, F. W., Waterbury, J. B. and Schlosser, U. (1986) '*Nitrospira marina* gen-nov sp-nov - A chemolithotrophic Nitrite-Oxidizing bacterium', *Archives of Microbiology*, 144(1).
- Webster, G., Embley, T. M., Freitag, T. E., Smith, Z. and Prosser, J. I. (2005) 'Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils', *Environmental Microbiology*, 7(5), pp. 676-684.
- Welsh, A., Chee-Sanford, J. C., Connor, L. M., Löffler, F. E. and Sanford, R. A. (2014) 'Refined *NrfA* Phylogeny Improves PCR-Based *nrfA* Gene Detection', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), pp. 2110-2119.

- Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X. and Degrange, V. (2008) 'Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like nxrA sequences in soil', *Fems Microbiology Ecology*, 63(2), pp. 261-271.
- Wilderer, P. A., Jones, W. L. and Dau, U. (1987) 'Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite', *Water Research*, 21(2), pp. 239-245.
- Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J. and Embley, T. M. (2013) 'An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life', *Nature*, 504(7479), pp. 231-236.
- Winkler, M. K. H., Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Sorokin, D. Y. and van Loosdrecht, M. C. M. (2012) 'Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6), pp. 1657-1666.
- Woese, C. R. and Fox, G. E. (1977) 'Phylogenetic structure of Prokaryotic domain - Primary kingdoms', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), pp. 5088-5090.
- Yan, C., Quoc Tuc, D., Chevreuil, M., Garnier, J., Roose-Amsaleg, C., Labadie, P. and Lauerma, A. M. (2013) 'The effect of environmental and therapeutic concentrations of antibiotics on nitrate reduction rates in river sediment', *Water Research*, 47(11), pp. 3654-3662.
- Yu, B. B., Wang, X., Yu, S., Li, Q. and Zhou, Q. X. (2014) 'Effects of roxithromycin on ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in the rhizosphere of wheat', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), pp. 263-272.
- Ziebis, W., Huettel, M. and Forster, S. (1996) 'Impact of biogenic sediment topography on oxygen fluxes in permeable seabeds', *Marine Ecology Progress Series*, 140(1-3), pp. 227-237.
- Zumft, W. G. (1997) 'Cell biology and molecular basis of denitrification', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), pp. 533-+.
- Zumft, W. G. and Korner, H. (1997) 'Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification', *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 71(1-2).



## 6 Annexe

---



DOI 10.1007/s11356-015-4159-6

## MICROBIAL ECOLOGY OF THE CONTINENTAL AND COASTAL ENVIRONMENTS

# Exposure to vancomycin causes a shift in the microbial community structure without affecting nitrate reduction rates in river sediments

Anniët M. Laverman & Thibaut Cazier & Chen Yan &  
Céline Roose-Amsaleg & Fabienne Petit & Josette Garnier &  
Thierry Berthe

Received: 16 September 2014 / Accepted: 20 January 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Antibiotics and antibiotic resistance genes have shown to be omnipresent in the environment. In this study, we investigated the effect of vancomycin (VA) on denitrifying bacteria in river sediments of a Waste Water Treatment Plant, receiving both domestic and hospital waste. We exposed these sediments continuously in flow-through reactors to different VA concentrations under denitrifying conditions (nitrate addition and anoxia) in order to determine potential nitrate reduction rates and changes in sedimentary microbial community structures. The presence of VA had no effect on sedimentary nitrate reduction rates at environmental concentrations, whereas a change in bacterial (16S rDNA) and denitrifying

(*nosZ*) community structures was observed (determined by polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis). The bacterial and denitrifying community structure within the sediment changed upon VA exposure indicating a selection of a non-susceptible VA population.

**Keywords** Nitrate reduction · Vancomycin · Community structure · *nosZ* · Bacterial antibiotic resistance · Flow-through reactors

## Introduction

The use of pharmaceuticals, their disposal and consequent presence in the environment has raised concern regarding its ecological impact (Santos et al. 2010). Among these pharmaceuticals, antibiotics are of special interest as the intensive use in human and veterinary medicine has resulted in the emergence of bacterial antibiotic resistance, nowadays considered as a worldwide public health problem. The environmental occurrence of antibiotics ranging from nanograms per liter in surface water to micrograms per liter in Waste Water Treatment Plant (WWTP) and hospital effluents, and up to milligrams per liter in the vicinity of discharges of pharmaceutical plants, has received attention over the past decade (Brown et al. 2006; Hernando et al. 2006; Oberle et al. 2012; Tamtam et al. 2008).

The effect of environmental levels of antibiotics on microorganisms and their role in the maintenance and dissemination of antibiotic resistance genes in the environment is still poorly understood. Chronic or significant contamination by one or several antibiotics could exert a selective pressure on the

Responsible editor: Philippe Garrigues

A. M. Laverman (✉)  
Université Rennes 1, CNRS EcoBio UMR6553, Rennes, France  
e-mail: anniet.laverman@univ-rennes1.fr

T. Cazier · C. Yan · C. Roose-Amsaleg · J. Garnier  
Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7619 Metis,  
75005 Paris, France

C. Roose-Amsaleg · J. Garnier  
CNRS, UMR 7619 Metis, 75005 Cedex 05 Paris, France

F. Petit · T. Berthe  
Normandie Université, UMR 6143 M2C, 76821 Mont-Saint-Aignan  
Cedex, Paris, France

F. Petit · T. Berthe  
CNRS, UMR 6143 M2C, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex,  
Paris, France

F. Petit · T. Berthe  
Normandie Université, SFR SCALE, 76821 Mont-Saint-Aignan  
Cedex, Paris, France



microbial community and favour the growth of antibiotic resistant or non-susceptible bacteria (Davies et al. 2006; Kohanski et al. 2010). Although antibiotic concentration in surface water is lower than the minimal inhibitory concentration (MIC, around 1 mg L<sup>-1</sup>), it has been reported that sub-inhibitory or sub-lethal concentrations (0.25–0.9 × MIC) can trigger bacterial DNA transcription or are involved in mutagenesis (Davies et al. 2006; Gullberg et al. 2011; Kohanski et al. 2010). Moreover, this chemical contamination is accompanied by a supply of antibiotic-resistant faecal bacteria, mainly released via WWTP effluents or by run off or leaching from soils. This input of genes from allochthonous bacteria could be involved in the spread and development of antibiotic resistance genes within autochthonous microbial communities. The presence of resistance genes may enhance the environmental resistome, i.e. all genes encoding antibiotic resistances within the microbial community, which could in turn be retro-transferred to potential pathogens (Baquero et al. 2008).

Beyond the problem of the emergence of antibiotic-resistant bacteria, the presence of antibiotic compounds in the environment can also affect diversity and activity of microbial communities involved in biogeochemical cycling (Kümmerer 2009; Thiele-Bruhn 2003). The presence of antibiotics in soils and sediments has indeed shown to affect denitrification rates (Costanzo et al. 2005; Kotzerke et al. 2008). However, most of these studies were carried out using high, therapeutic concentrations (milligrams per liter or milligrams per kilogram), which is in contrast with the environmentally observed concentrations (nanograms-micng-μg L<sup>-1</sup>). Recently, Underwood et al. (2011) demonstrated the inhibiting effect of environmentally relevant sulfamethoxazole concentrations on denitrifying abundance and community structure as well as on nitrate reduction rates in groundwater enrichments.

Vancomycin (glycopeptide family, VA) is among the older antibiotics of clinical use—for almost 60 years. It is effective against most Gram-positive cocci and bacilli, inhibiting cell wall synthesis (peptidoglycan), thus affecting dividing bacteria. Like most antibiotics vancomycin is partially metabolized and discharged to sewage treatment plant or directly in water or soil (Dolliver et al. 2008). The presence of vancomycin in treated effluents from hospitals in France has been reported with concentrations ranging from 1.6 to 37.3 μg L<sup>-1</sup> (Passerat et al. 2010; Dinh 2012), and at 29 ng L<sup>-1</sup> in wastewater effluents (Zuccato et al. 2010). The removal of vancomycin occurring during the activated sludge process or UV treatment has been estimated to 52 and 28 %, respectively (Li and Zhang 2011). This antibiotic has also been detected in surface water impacted by wastewater effluents with concentrations ranging from 0.44 to 5.17 ng L<sup>-1</sup> (Zuccato et al. 2010; Dinh 2012). In Gram-positive bacteria, such as enterococci, resistance to vancomycin is due to the presence of eight operons (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanM*, *vanC*, *vanE*, *vanG* and *vanL*), that encode enzymes involved in (1) production of modified peptidoglycan

precursors and (2) removal of the vancomycin-binding target (Lebreton et al. 2011). The actual origin of the genes responsible for high-level vancomycin resistance in enterococci has been linked to soil *Paenibacillus* spp. (Guardabassi et al. 2005).

Denitrification, the anaerobic reduction of nitrate (NO<sup>-</sup>) to gaseous nitrogen (N<sub>2</sub>), is a key process in the biogeochemical nitrogen cycle and the primary biological pathway by which biologically fixed or synthetic added nitrogen is converted to a gaseous form and removed from ecosystems. Denitrifying bacteria are facultative anaerobes and a phylogenetically diverse group of microorganisms found in the domain Archaea and Bacteria, being either Gram-negative or Gram-positive (Cheneby et al. 2000; Philippot 2002). The enzyme involved in the last step during denitrification, nitrous oxide reductase (*nosZ*) converting nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) to N<sub>2</sub>, has been widely used as a molecular marker for this process (Scala and Kerkhof 1998), targeting mainly the Gram-negative bacteria (Jones et al. 2011; Philippot 2002). Possible negative effects of antibiotics, or more specifically VA, on denitrification rates in riverine sediments might affect the natural transformation of nitric pollution into inert gas. Furthermore, to the best of our knowledge, resistance of denitrifiers towards VA, including possible acquisition of resistance genes from pathogens towards this functional group, has not been explored.

Therefore, the goal of this study was to determine the effects of VA on nitrate reduction rates and structure of the denitrifying and whole bacterial community structure in river sediments. In addition to this we investigated the resistance towards VA among denitrifying enrichments from the same sediments. To this end, we used sediments exposed to different VA concentrations, collected near a Waste Water Treatment Plant (WWTP) receiving both domestic and hospital waste (effluent WWTP up to 8 μg L<sup>-1</sup> VA, Dinh 2012). Nitrate reduction rates in sediments were determined using flow-through reactors (Laverman et al. 2006) allowing continuous supply of VA for 3 weeks. To determine the effect of VA on the total bacterial (16S rDNA) and the denitrifying (*nosZ*) communities, we compared the community structure in VA amended sediments using the polymerase chain reaction (PCR)–denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approach (Muyzer et al. 1993; Throbäck et al. 2004). Furthermore, we investigated the resistance towards VA of denitrifying enrichments by an adaptation of the MIC approach.

## Material and methods

### Study site

The sediments used for this study were collected from the Charmoise River, a small tributary of the Orge River (North

of France) in February 2010 (sediment incubations) and February 2012 (MIC enrichments). The site in the Charmoise River was chosen due to its vicinity to a Waste Water Treatment Plant, receiving both hospital and domestic effluents of Fontenay-lès-Briis (Seine basin, France). The hospital fuelling the WWTP contains 363 beds and the glycopeptide (mainly vancomycin) use in 2010 was 1.495 kg (T. Dinh, pers. comm.) The WWTP has a capacity of 5,000 equivalent inhabitants and treats 1000 m<sup>3</sup> wastes per day and discharges its drain via a 50 m long channel in the Charmoise River. Sediments (0–1 cm depth) for our study were sampled 10 m upstream and 10 m downstream of the WWTP output.

Turbidity, oxygen concentrations, temperature and pH of the overlying water at the time of sampling were determined using a multi-parameter sensor (YSI 6600 V2-4). The sediment moisture content was calculated from determining the weight loss of a known quantity of sediment (5 cm<sup>3</sup>) after drying at 105 °C for 24 h. VA was extracted from the sediment with methanol (Tamtam et al. 2011) and analysed by an LC-MS/MS system, for details regarding this method see Dinh et al. (2011).

#### Determination of nitrate reduction rates

Sediments were placed in flow-through reactors (FTRs) and continuously supplied with nitrate (5 mM NaNO<sub>3</sub>) and different VA concentrations (0, 1, 200 and 1000 µg L<sup>-1</sup>) by a peristaltic pump (Gilson, France) with a flow rate of 4 mL h<sup>-1</sup>. All treatments were run in triplicates for a period of 3 weeks at 20 °C (±2 °C) in the laboratory in the dark to minimize the photodegradation of the antibiotics as well as to prevent photosynthesis in the sediment. To assure anoxic conditions, the inflow solutions were purged once a day with nitrogen gas (30 min) to remove all traces of oxygen. The outflow was collected once a day and stored at 4 °C until analysis of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Concentrations of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) were analysed with a Dionex ICS 3000 ion chromatograph using an auto sampler AS50.

Nitrate reduction rates were calculated over the period 7 to 24 days using the following equation:

$$R \propto \frac{\Delta C \cdot Q}{V} \quad \delta 1b$$

Where  $\Delta C$  is the difference of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> between inflow and outflow solution (nmol L<sup>-1</sup>),  $Q$  is the volumetric flow rate (milliliters per hour) and  $V$  volume of the reactor (cubic centimeter). Nitrate reduction rates are used throughout the text, as only net nitrate reduction rates were measured. Note that the rates determined are potential rates as nitrate is supplied to the sediment, whereas carbon used during this process is derived from the sediment. For further details regarding the FTR approach see Laverman et al. (2006) and Yan et al. (2013).

#### Minimal inhibiting concentration of the environmental microbial community (MIC-E)

In order to determine the effect of VA on the denitrifying community, we used a denitrifying medium amended with different VA concentrations. A bacterial suspension of the sediment was prepared by suspending 5 cm<sup>3</sup> of fresh sediment in 45 mL saline solution (2 % NaCl w/v and 0.3 % MgCl<sub>2</sub> w/v) and vortexed for 1 min (2,500 rpm). Sterile Hungate tubes with Durham tubes containing medium for denitrifiers (1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.0 mM NH<sub>4</sub>Cl, 4.0 mM KCl, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.10 g L<sup>-1</sup> of yeast extract, 5.0 mM KNO<sub>3</sub>, 5 mM Na-Succinate, 5 mM Na-acetate, 5 mM lactate, 1.0 mL resazurin at 0.5 g L<sup>-1</sup> and 1.0 mL of SL9 solution (Tschech and Pfennig 1984), pH adjusted to 7.0–7.5 using a 10-M NaOH solution) were then inoculated with these suspensions (1 mL suspension in 9 mL medium). The denitrifying enrichment after 3 days of growth was diluted in saline solution to achieve an optical density of 0.01 at 580 nm. One milliliter of this suspension was then injected in a Hungate tube containing a Durham tube and 9 mL of medium with VA (at different concentrations) and 1 tube per experiment without VA serving as a control. Each experiment was conducted in triplicate, and tubes were incubated at 30 °C for 6 days. The range of VA concentrations tested was: 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128 and 256 mg L<sup>-1</sup>. Growth of denitrifiers was determined according to turbidity and gas production inside the Durham tubes. As a MIC is defined being a minimal inhibiting concentration for pure culture, the concentration of VA that inhibits the enrichment will hereafter be indicated as a MIC-E (the minimal inhibiting concentration of an enrichment or environmental community).

#### Molecular analysis

Bacterial and denitrifying community structures in the sediments (3 weeks) subjected to different vancomycin concentrations were determined by PCR and DGGE analyses. DNA was extracted from sediment using the 'Powersoil<sup>TM</sup> DNA Isolation Kit' (MoBio). In order to study the whole bacterial community structure, PCR amplification with GoTaq (Promega, Madison, WI, USA) of a 180-bp fragment of 16S rDNA was conducted using the primer sets and conditions described by Muyzer et al. (1993) (R518 5'-ATTACCGCGGCTGCTGCTGG and F357 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG with a 40-bp GC-clamp attached to the 5' end). Primer annealing took place at 55 °C, and PCR reaction was 30 cycles long. To characterize the N<sub>2</sub>O reducing bacteria, PCR amplification with MyTaq (BioLine, London, UK) of a 411-bp fragment of the *nosZ* gene was conducted using the *nosZ*-F (5'-CGYTGTTTC MTGGACAGCCAG; (Kloos et al. 2001) and *nosZ*1622Rb (5'-CGCRASGGCAASAAGGTSCG; (Throback et al. 2004) primer set, with a 33-bp GC-clamp attached to the 5' end of the

latter primer. Primer annealing was conducted with a touch-down from 62 to 55 °C during 35 cycles followed by 10 cycles at 55 °C for sediment samples, and 45 cycles at 55 °C for enrichment samples. The 16S rDNA fragments will be referred to throughout the text as the bacterial community, and the nosZ fragments will be referred to as the denitrifying community.

After checking amplification and normalizing DNA quantity on a 2 % agarose gels, the PCR products were then separated in relation to their sequence with the DGGE technique using the Ingeny phorU system (Ingeny, Goes, the Netherlands) using a 9 % (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide ratio, 37.5:1) in 1X TAE buffer (40 mM Tris acetate, 40 mM acetic acid and 10 mM EDTA, pH 7.6). The denaturants used were urea and formamide at 33.6 % (g/v) and 32 % (v/v) for an 80 % denaturing solution, respectively. The gradients used were 40–70 % denaturant for 16S rDNA and nosZ, and the migration was realized in 1× TAE at 62 °C with a voltage between 130 and 160 V for optimum amperage of 70 mA per gel for 17 h. After electrophoresis, gels were stained with 1× TAE buffer containing 1 % Sight DNA Stain (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and then photographed using a UV imaging system. The DGGE gel images were then analysed with 'GelCompar, fingerprint and gel analysis software II' version 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) to compare the lanes of migration (number and position of bands) using either the Jaccard or Bray-Curtis coefficient and building a tree with the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA). Bacterial species richness was determined from the number of bands on DGGE corresponding to the number of operational taxonomic units (OTUs)

## Statistical analyses

The Kruskal–Wallis non parametrical test and Tukey pairwise comparison were used to identify significant effects of antibiotic contaminated sediment versus uncontaminated sediment on nitrate reduction rates. Significant differences were accepted at  $p < 0.05$ . All statistical analyses were calculated using SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA).

## Results

### Site characteristics

The different characteristics for the two sampling sites, upstream and downstream of the WWTP outlet can be found in Table 1. Overall, pH, temperature, conductivity and oxygen concentrations in the overlying water were similar for the two

Table 1 Overview of the characteristics of the sampling sites, upstream and downstream of the WWTP outlet

	Variable	Unit	Upstream	Downstream
Water	pH		8.25	7.98
	T	°C	3.19	3.91
	Conductivity	mS	0.632	0.678
	Turbidity	NTU <sup>(1)</sup>	7.6	23
	O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup>	9.83	10.12
Sediment	[VA] <sup>(2)</sup>	ng gds <sup>-1</sup>	<5	62
	16S rRNA bands <sup>(2)</sup>		32	33
	nosZ bands <sup>(2)</sup>		6	6
	16S rRNA similarity	%	65	
	nosZ similarity	%	20	

Concentrations of VA in the sediments were measured in February 2010 (n=2) and expressed per gram dry sediment (gds<sup>-1</sup>). The total bacterial and denitrifying richness were determined in February 2012

(1) NTU nephelometric turbidity unit

(2) Two separate sediment or DNA extractions (n=2)

sites. In contrast, the turbidity was higher in the downstream waters with the input of suspended solids by the treated waste water. VA concentrations were below the detection limit (5 ng g<sup>-1</sup>, Dinh et al. 2011) in the upstream sediments, whereas on average 62 VA ng g<sup>-1</sup> was detected in the downstream sediments. Species richness, i.e. the number of OTUs, was not different between the upstream and downstream site for either the total or the denitrifying bacterial communities (Table 1). However, the structure of the total and denitrifying bacterial communities was different between both sites (65 and 20 % similarity in band pattern, Table 1).

### Effect of VA on nitrate reduction rates and community structure

An overview of the nitrate reduction rates in the upstream and downstream sediments amended with different VA concentrations can be found in Table 2. Average nitrate reduction rates (NRR) in upstream sediments were 156 (±16) nmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> and 165 (±21) nmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> cm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> in downstream sediments. No significant differences in NRR were observed for the different VA concentrations compared to the control in the upstream sediments (Kruskal–Wallis,  $p > 0.05$ ). A small, but significant decrease in nitrate reduction rates (Tukey Test,  $p < 0.05$ ) was observed in the downstream sediments supplied with 1000 µg L<sup>-1</sup> VA compared to the control.

The number of total bacterial (16S rRNA) OTUs observed in the upstream and downstream sediments decreased after the 3 week exposure to nitrate in the anaerobic flow-through reactors, regardless of treatment with vancomycin (Fig. 1.). The number of OTUs for the un-treated controls (no vancomycin) were unaffected or reduced by 16 % for the upstream and

Table 2 Overview of the nitrate reduction rates in sediments upstream and downstream of the WWTP outlet supplied with different VA concentrations

Site	Vancomycin concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Nitrate reduction rates ( $\text{nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ )
Upstream	Control	$156 \pm 16$
	1	$133 \pm 26$
	200	$122 \pm 35$
	1000	$130 \pm 11$
Downstream	Control	$165 \pm 21$
	1	$143 \pm 12$
	200	$184 \pm 21$
	1000	$130 \pm 15^*$

The effect of VA on the nitrate reduction rates were tested within the sediments of the same site

\* $p < 0.05$ , significant difference (Tukey)

downstream sediments, respectively. In the downstream community, there was a trend of a decreasing number of OTUs with increasing vancomycin treatment. For the upstream and downstream communities, samples clustered by vancomycin treatment, low vancomycin treatments were more similar to the untreated control than the high vancomycin treatments (Fig. 1). In the upstream sediments, the addition of vancomycin changed the bacterial community structure as shown by a decrease in similarity of the bacterial communities, from 73 % similarity between the 0 and 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 63 % between 0 and 200 and only 54 % similarity between 0 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  vancomycin. For the downstream sediments, a similar change in community was observed with the non-vancomycin amended sediments showing a 65 % similarity with 1 and

200  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 59.5 % similarity with 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The corresponding dendrograms show that the change in bacterial community structure is similar in the upstream (53 % similarity with structure of all other communities) and the downstream (59.5 %) sediments.

The richness of the denitrifying community represented by the  $\text{N}_2\text{O}$  reducing bacteria (i.e. *nosZ* gene) in the sediments supplied with and without VA is shown in Fig. 2. The number of OTUs, varied between 5 and 7 in these sediments. Overall, the comparison between the DGGE patterns of *nosZ* in initial sediments and those incubated for 3 weeks with and without VA in both upstream and downstream sediments exhibits little variation in richness of the denitrifying bacterial community. On the contrary, in the downstream sediments, the initial *nosZ* diversity was very distinct (30.5 % similarity) from the incubated sediments (Fig. 2), showing 75.5 % similarity between them. In the upstream sediments, a 54 % and a 37 % similarity between the control, and respectively, the lowest (1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and highest (200 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) vancomycin concentrations indicate a shift in community structure. Overall, a 75 % similarity between non-amended and vancomycin amended sediments indicate a minor impact of vancomycin on the community structure.

#### Vancomycin resistance of the culturable denitrifying bacteria

In order to investigate to what extent denitrifiers were resistant to vancomycin, we determined the MIC of denitrifying Enrichments (MIC-E) towards VA of a culturable denitrifying subpopulation. Denitrifying enrichments were grown on denitrifying medium containing different VA concentrations in order to determine the concentration of VA that inhibited

Fig. 1 Cluster analysis (Bray–Curtis) of the total bacterial community structure of the sediments before (T0) and after VA exposure, upstream (a) and downstream (b) of the WWTP outlet. The number of bands (OTU), representing richness, is displayed with a histogram and the similarity of community composition with a dendrogram. T0 stands for initial sediments and 0, 1, 200, and 1000  $\mu\text{g/L}$  VA supply during 3 weeks of incubation

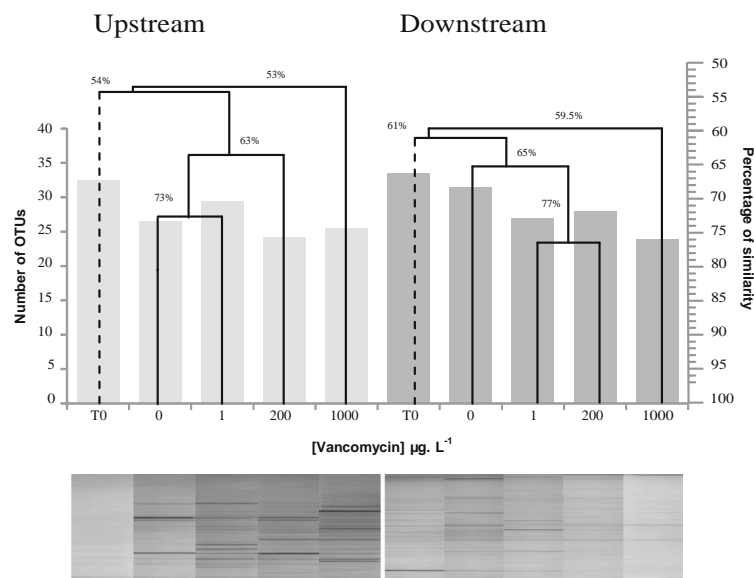
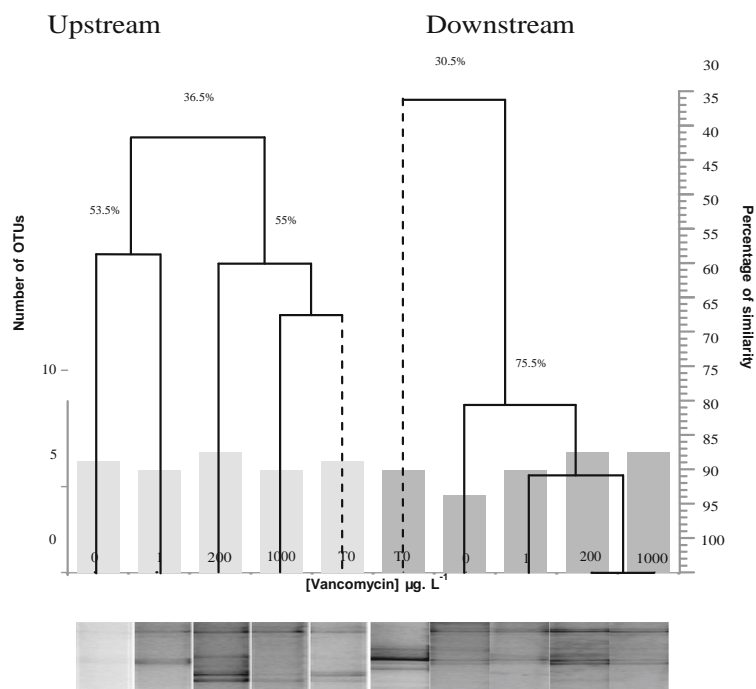


Fig. 2 Cluster analysis (Jaccard) of the denitrifying bacterial community structure of the sediments before (T0) and after VA exposure, upstream (a) and downstream (b) of the WWTP outlet. The number of nosZ bands (OTU), representing richness, is displayed with a histogram and the similarity of community composition with a dendrogram. T0 stands for initial sediments and 0, 1, 200, and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  VA supply during 3 weeks of incubation



growth of this enrichment. The VA concentrations tested were above the known MIC of pathogenic bacteria ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ), allowing determination of MIC of the denitrifying community from a medical perspective. Figure 3 shows the number of positive denitrifying growth among the triplicate cultures, at the different VA concentrations in time (5 days). Growth after 1 day showed that the downstream denitrifying communities were most sensitive towards VA with inhibition observed (MIC-E) at  $8 \text{ mg L}^{-1}$ , compared to  $64 \text{ mg L}^{-1}$  for the upstream enrichments. However from 2 days, all enrichments were able to grow at VA concentrations up to  $256 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 3), suggesting that at least one strain was able to grow, albeit at lower growth rates for the upstream sediments.

## Discussion

In this study, we investigated the effect of VA on the total bacterial and denitrifying communities in river sediments upstream and downstream of a WWTP effluent. The sediments downstream of the WWTP receive the effluent of the treatment plant that treats both domestic and hospital waste waters and have shown to be contaminated by several antibiotics including VA (Dinh et al. 2011). To our knowledge, there are only a limited number of studies that report the effect of antibiotics on the structure and function of bacterial communities in river sediments and in particular on the activity of denitrifiers. Our study shows that nitrate reduction rates were

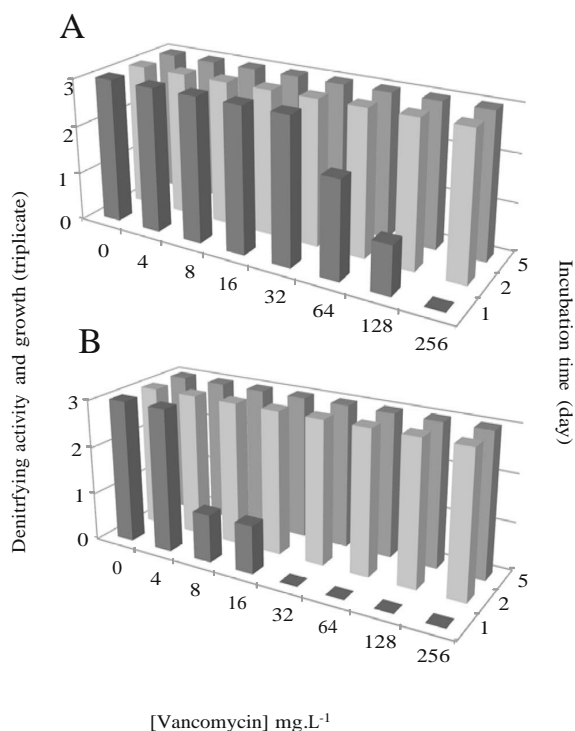


Fig. 3 Growth of denitrifiers (gas production) during the MIC-E experiment of the different denitrifying communities from the Charmoise sediment upstream (a) and downstream (b)



unaffected in these river sediments, except at therapeutic concentrations in the downstream sediment. In similar river sediments, nitrate reduction rates were unaffected by a chronic exposure to tetracycline at environmentally relevant concentrations (0.5, 20 and 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Roose-Amsaleg et al. (2013) or to concentrations ( $<1 \text{ mg L}^{-1}$ ) of flumequine and sulfamethoxazole (Yan et al. 2013). In contrast, exposure to erythromycin, clarithromycin and amoxicillin at  $1 \text{ mg L}^{-1}$  led to the decrease in denitrification rates in sediments (Costanzo et al. 2005). In groundwater, Ahmad et al. (2014) also reported an inhibition of the activity of denitrifying bacteria in the presence of sulfamethazine ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) and chlortetracycline ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ). As VA only affects Gram-positive bacteria, the lack of inhibition in our study can be related to (a) the initial presence of Gram-negative denitrifiers, (b) by the initial occurrence of non-susceptible bacteria (Wright 2003) or (c) a shift in initial bacterial communities chronically exposed to microbial and chemical contamination from the treated input of the WWTP favouring non susceptible bacteria (Rizzo et al. 2013).

In upstream and downstream sediments, VA contamination induced a change in the diversity of the total microbial community. At low and intermediate VA concentrations (up to  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ), the sedimentary bacterial community structures show a minor shift. Changes in the bacterial community structure were observed at the highest VA concentration ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), approaching therapeutic concentrations. Antibiotics, even those designed to be broad-spectrum drugs, have their selective effects on various groups of microbes. The selective antibiotic effects alter the relative abundance of microbial species (Ding and He 2010). A change in bacterial community structure upon the application of antibiotics has been observed in soil (Hammesfahr et al. 2008; references in Ding and He 2010). In this study, the modification of the structure of microbial communities could be explained by the disappearance of susceptible strains; whereas, active but non-growing Gram-positive bacteria persisted and maintenance or development of non-susceptible or resistant bacteria. Moreover, the persistence of bacteria in the presence of  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of VA can also be explained by the degradation of this antibiotic by heterotrophic denitrifiers as previously shown for sulfamethoxazole (Nodler et al. 2012).

The impact of antibiotics on denitrifying bacteria has been assessed mainly through the quantification of genes encoding the nitrate, nitrite and nitrous oxide reductases and diversity analysis of these genes by DGGE (Kleineidam et al. 2010; Ollivier et al. 2010; Hammesfahr et al. 2008). Ollivier et al. (2010) reported that the abundance of *nosZ* was affected by sulfadiazine but the impact on the transcript level was less pronounced, suggesting that a part of the denitrifiers was tolerant or resistant towards this antibiotic. In soils amended with manure and sulfadiazine (SDZ, 40 and  $100 \text{ mg SDZ kg}^{-1}$  soil), the community composition of *nirS* nitrite reducers

investigated by DGGE did not change despite the observed alterations in abundance (Kleineidam et al. 2010). In contrast, DGGE patterns showed effects of SDZ ( $10$  and  $100 \text{ mg g}^{-1}$ ) on soil bacterial community structures. In our study, the richness of the denitrifying community (*nosZ*) was not affected by VA concentrations; whereas, shifts in the structure of these communities were observed. In upstream sediments, the different VA applications were not correlated to the denitrifying community structures (*nosZ*). In downstream sediment, despite a clear shift in denitrifying community structure compared to the initial sediment, this structure is highly comparable in sediments incubated for 3 weeks with and without VA. This could be explained by the fact that the primers used for the *nosZ* gene amplification targets mainly Gram-negative denitrifiers (Jones et al. 2011), which are naturally resistant to vancomycin.

The MIC-E determined from denitrifying enrichments indicated the presence of resistant or non-susceptible denitrifiers in upstream and downstream sediments, which were able to grow at VA concentrations higher than environmental concentrations ( $>1 \text{ mg L}^{-1}$ ). This is consistent with the detection of denitrifying activity in sediments exposed to therapeutic tetracycline concentrations ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; Roose-Amsaleg et al. 2013). Further work will require the characterization of culturable denitrifiers (Gram-negative vs Gram-positive bacteria) growing at environmental ( $<1 \text{ mg L}^{-1}$ ) and higher VA concentrations. Furthermore, there is a need to confirm the presence of VA resistance genes among these culturable denitrifiers.

In conclusion, our results demonstrated a minor effect of VA towards nitrate reduction rates, partly due to a change in community structure and due to the resistance of the denitrifiers in these sediments towards VA. Further research regarding the occurrence of VA resistance genes is required to investigate whether the nitrate reduction rates detected in presence of VA is related to resistant or non-susceptible bacteria.

**Acknowledgments** The authors like to thank Benjamin Mercier, Olivier Tronquart for assistance in the field, Tuc Dinh, Fabrice Alliot for the help during antibiotic analysis. This work was financed by the Region Ile de France (RD2S project 2009-07), the program Piren Seine and EC2CO FLASH CNRS.

## References

- Ahmad M, Vithanage M, Kim K, et al (2014) Inhibitory effect of veterinary antibiotics on denitrification in groundwater: A microcosm approach. *Sci. World J.* 2014 (in press)
- Baquero F, Martinez JL, Canton R (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotech* 19:260–265
- Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy, effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci Total Environ* 366:772–783

- Cheneby D, Philippot L, Hartmann A, Henault C, Germon JC (2000) 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol* 34:121–128
- Costanzo SD, Murby J, Bates J (2005) Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Mar Pollut Bull* 51:218–223
- Davies J, Spiegelman GB, Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 9:445–453
- Ding C, He J (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:925–941
- Dinh MQT (2012) Transfert et comportements d'antibiotiques à l'échelle du bassin élémentaire. PhD thesis, L'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université Pierre et Marie Curie
- Dinh T, Alliot F, Moreau-Guigon E, Eurin J, Chevreuil M, Labadie P (2011) Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta* 85:1238–1245
- Dolliver H, Gupta S, Noll S (2008) Antibiotic degradation during manure composting. *J Environ Qual* 37:1245–1253
- Guardabassi L, Perichon B, van Heijenoort J, Blanot D, Courvalin P (2005) Glycopeptide resistance vanA operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4227–4233
- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilback C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *Plos Pathog* 7
- Hammesfahr U, Heuer H, Manzke B, Smalla K, Thiele-Bruhn S (2008) Impact of the antibiotic Sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biol Biochem* 40:1583–1591
- Hernando MD, Mezcuca M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69:334
- Jones CM, Welsh A, Throback IN, Dorsch P, Bakken LR, Hallin S (2011) Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne  $N_2$ - and  $N_2O$ -producing *Bacillus* isolates harboring the nosZ gene. *FEMS Microbiol Ecol* 76:541–552
- Kleineidam K, Sharma S, Kotzerke A, Heuer H, Thiele-Bruhn S, Smalla K, Wilke BM, Schlöter M (2010) Effect of Sulfadiazine on abundance and diversity of denitrifying bacteria by determining nirK and nirS genes in two arable soils. *Microbiol Ecol* 60:703–707
- Kloos K, Mergel A, Rosch C, Bothe H (2001) Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Aust J Plant Physiol* 28:991–998
- Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 37:311–320
- Kotzerke A, Sharma S, Schauss K, Heuer H, Thiele-Bruhn S, Smalla K, Wilke BM, Schlöter M (2008) Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to Sulfadiazine loads in pig-manure. *Environ Pollut* 153:315–322
- Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment—a review - part I. *Chemosphere* 75:417–434
- Laverman AM, Van Cappellen P, van Rotterdam-Los D, Pallud C, Abell J (2006) Potential rates and pathways of microbial nitrate reduction in coastal sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 58:179–192
- Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N et al (2011) D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4606–4612
- Li B, Zhang T (2011) Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants. *Chemosphere* 83:1284–1289
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695–700
- Nödler K, Licha T, Barbieri M, Pérez S (2012) Evidence for the microbially mediated abiotic formation of reversible and non-reversible sulfamethoxazole transformation products during denitrification. *Water Res* 46:2131–2139
- Oberle K, Capdeville MJ, Berthe T, Budzinski H, Petit F (2012) Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ Sci Technol* 46:1859–1868
- Ollivier J, Kleinedam K, Reichel R et al (2010) Effect of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundances of genes and transcripts involved in nitrogen transformation in the root-rhizosphere complexes of maize and clover. *Appl Environ Microbiol* 76:7903–7909
- Passerat J, Tamtam F, Le Bot B, Eurin J, Chevreuil M, Servais P (2010) Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine. *Eur J Water Qual* 41:1–13
- Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *BBA-Gene Struct Expr* 1577:355–376
- Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ* 447:345–360
- Roose-Amsaleg C, Yan C, Hong AM, Laverman AM (2013) Chronic exposure of river sediments to environmentally relevant levels of tetracycline affects bacterial communities but not denitrification rates. *Ecotoxicology* 22:1467–1478
- Santos L, Araujo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro M (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175:45–95
- Scala DJ, Kerkhof LJ (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *FEMS Microbiol Lett* 162:61–68
- Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Dinh QT, Clement M, Chevreuil M (2008) Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci Total Environ* 393:84–95
- Tamtam F, Le Bot B, Dinh T, Mompelat S, Eurin J, Chevreuil M, Bonte P, Mouchel JM, Ayrault S (2011) A 50-year record of Quinolone and Sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments. *J Soil Sed* 11:852–859
- Thiele-Bruhn S (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166:145–167
- Throback IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* 49:401–417
- Tscheck A, Pfennig N (1984) Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch Microbiol* 137:163–167
- Underwood JC, Harvey RW, Metge DW, Repert DA, Baumgartner LK, Smith RL, Roane TM, Barber LB (2011) Effects of the antimicrobial Sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment. *Environ Sci Technol* 45:3096–3101
- Wright GD (2003) Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opin Chem Biol* 7:563–569
- Yan C, Dinh QT, Chevreuil M et al (2013) The effect of environmental and therapeutic concentrations of antibiotics on nitrate reduction rates in river sediment. *Water Res* 47:3654–3662
- Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Melis M, Fanelli R (2010) Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J Haz Mater* 179:1042–1048

## 7 Table des Illustrations

---





Figure 1 – Schéma d’occupation du sol du bassin versant de la Seine. (Source : seine-aval.crihan.fr) .....	15
Figure 2- Carte des surplus azotés en kg/ha/an sur le bassin de la Seine en 2003 (source : eaufrance.fr) .....	16
Figure 3- Carte de l’altération des eaux souterraines par les pesticides (source : eau-seine-normandie.fr) .....	16
Figure 4- Utilisation de l’eau dans le bassin de la Seine (source eau-Seine-normandie.fr). Prélèvement d’eau : volume prélevé. Consommation nette : volume prélevé – volume rejeté .....	17
Figure 5- Cycle de l’azote simplifié, centré sur le nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ). Orga-N = azote organique ; DNRA = Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium ; anammox = oxydation anaérobie de l’ammonium .....	19
Figure 6 - Nitrification, enzymes et intermédiaires métaboliques .....	20
Figure 7- Dénitrification, enzymes et intermédiaires métaboliques.....	21
Figure 8- Anammox, enzymes et intermédiaires métaboliques .....	23
Figure 9 - DNRA, enzymes et intermédiaires métaboliques .....	23
Figure 10 - Hypothèses de l’influence des rejets de STEP sur les Procaryotes de la Seine ainsi que sur la dynamique du nitrite entre la colonne d’eau, le sédiment et les eaux usées .....	25
Figure 11 - Carte des points de prélèvement d’eau et de sédiment dans l’agglomération parisienne .....	28
Figure 12 - Prétraitement des échantillons prélevés dans la colonne d’eau .....	30
Figure 13 - Prétraitement des carottes de sédiments .....	31
Figure 14- Carte des prélèvements de sédiment et d’eau de surface amont (en bleu) et en aval (en rouge) de la STEP SAV (situation des rejets montrée par une flèche et des pointillés).....	48

Figure 15- Contenu en eau dans les sédiments prélevés en amont (en blanc) et en aval (en noir) de la STEP, représenté par la moyenne de triplicats et de l'écart type pour le pourcentage d'eau (m/m). ..... 53

Figure 16- Profils de l'oxygène ( $O_2$ ) dans le sédiment en amont et en aval de la STEP SAV, moyenne et écart type..... 54

Figure 17 - Variation temporelle (h) de la quantité totale de nitrite (en  $\mu\text{mole}$ ) dans l'eau surnageante pour le sédiment prélevé en amont ou en aval de la STEP SAV (triplicats). Ce graphe représente la quantité totale de nitrite présente dans le milieu, afin d'évaluer plus facilement la production ou la consommation du nitrite par le sédiment. L'équation de la courbe de tendance ainsi que le  $R^2$  sont indiqués au-dessus de la courbe associée à chaque expérience en triplicat. .... 55

Figure 18 - Profil de l'ammonium [ $NH_4^+$ ] du nitrite [ $NO_2^-$ ] et du nitrate [ $NO_3^-$ ] en  $\mu\text{M}$  dans l'eau surnageante (-1 cm) ainsi que dans l'eau interstitielle (1-8 cm) en amont et en aval de la STEP SAV. La moyenne des duplicats est représentée par un cercle, avec les valeurs obtenues dans les 2 carottes pour chaque site sont représentés par la dispersion, alors que les sites sont représentés par des couleurs différentes (amont en blanc et aval en noir). ..... 57

Figure 19 - Abondance des gènes de l'ARNr 16S des Procaryotes (Bactéries et Archées) totaux (copie de gène/g sédiment sec) sur une échelle logarithmique dans le sédiment en fonction de la profondeur. Les données ont été acquises en triplicat (3 échantillons, moyenne et écart type). ..... 59

Figure 20 - Abondance des gènes indicateurs des Procaryotes nitrifiants (copie de gène/g sédiment sec) sur une échelle logarithmique dans le sédiment en fonction de la profondeur. Les données ont été acquises en triplicats (3 échantillons et 3 mesures par échantillon, moyenne et écart type). Pour une estimation plus précise du nombre d'organisme, se référer à la partie 1.II.6. .... 60

Figure 21 - Abondance des gènes indicateurs des Procaryotes dénitrifiants et responsables de la DNRA (copie de gène/g sédiment sec) sur une échelle logarithmique dans le sédiment en fonction de la profondeur. Les données ont été acquises en triplicats (3 échantillons, moyenne et écart type). Pour une estimation plus précise du nombre d'organisme, se référer à la partie 1.II.6..... 61

Figure 22 - Abondance des gènes marqueurs des Procaryotes impliqués dans la dynamique du nitrite (copies de gène par g de sédiment sec) dans le sédiment en amont et en

aval de la STEP SAV. Les abondances des groupes impliqués dans la dynamique du nitrite sont représentées en fonction de la profondeur dans les carottes..... 66

Figure 23 - Map of the Seine River system around Paris. Paris is taken as the reference station (km 0). All distances to the other stations are relative to Paris-Austerlitz ..... 78

Figure 24 - Nitrate, nitrite and ammonium concentrations in the water column from Choisy-le-Roy to Méricourt along the Seine River (averaged values from monthly sampling from February 2012 to February 2013). Arrows indicate the SAV WWTP effluent..... 82

Figure 25 - Example of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation rates as a function of added  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  in the SAV WWTP effluent batch experiments in November 2012. Kinetic parameters ( $R_{\text{max}}$  and  $K_M$ ) adjusted with the least-square method are indicated in each plot. The grey dashed lines indicates  $R_{\text{max}}/2$  in y-axis and  $K_M$  in x-axis. The minimal  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations tested in the batch experiment are the initial concentration in the water sample..... 84

Figure 26 -  $R_{\text{max}}$  and  $K_M$  efficiency (%) as a function of temperature for  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation in batch experiments at Poissy in May 2013. The efficiency is the ratio of the value at the temperature  $T_i$  divided by the value at  $20^\circ\text{C}$ . ..... 85

Figure 27 -  $R_{\text{max}}$  and  $K_M$  efficiency (%) as a function of temperature for  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation at Poissy in May 2013. The efficiency is the ratio of the value at the temperature  $T_i$  divided by the value at the temperature at  $20^\circ\text{C}$ ..... 86

Figure 28 - In situ rates of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation (a) upstream and (b) downstream the SAV WWTP (at Asnières and Poissy) in April, November 2012 and May 2013. The net nitrite flux (production-consumption) is indicated for each case..... 87

Figure 29 - Dissolved inorganic nitrogen flows ( $\text{T N d}^{-1}$ ) from -20 km (Choisy) to 120 km (Méricourt) from Paris for the campaigns in spring and autumn 2012-13 (minimum and maximum flows observed in April, November 2012 and May 2013). Nitrifying  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  oxidation fluxes are indicated upstream (blue) and downstream (red) the WWTP. Fluxes from SAV WWTP and Oise River are indicated by dark and light grey arrows, respectively. Benthic nitrogen fluxes determined by Raimonet, Vilmin et al. (2015) are indicated by brown arrows. The main WWTP influence being SAV, the other WWTP (e.g. SAM and SEC) are ignored in this figure. .... 88

Figure 30 - Carte des sites de prélèvements d'eau le long de la Seine en Ile-de-France ainsi que des rejets de la station d'épuration Seine Aval. ....	107
Figure 31 - Débit de la Seine à la station d'Austerlitz (Paris) pendant la période mars 2012-février 2013 (les cercles rouges indiquent les prélèvements étudiés en DGGE) .....	110
Figure 32 - Variation annuelle (mois indiqués en abscisse) de la diversité et de la richesse des Bactéries totales. Le nombre d'UTO est représenté sous forme de diagramme, avec l'échelle à gauche, et la similarité, calculée avec l'indice de Jaccard, sous forme de dendrogramme, avec l'échelle à droite. Comparaison des communautés issues de SAM et Asnières, et des communautés issues de SAV et Poissy. Les résultats obtenus pour les STEPs sont identifiés par la couleur rouge, et les résultats obtenus pour la rivière par la couleur bleue. ....	113
Figure 33 - Diversité des Procaryotes totaux, Bactéries et Archées en août et décembre. Le nombre d'UTO est représenté sous forme de diagramme, avec l'échelle à gauche, et la similarité sous forme de dendrogramme, avec l'échelle à droite. ....	114
Figure 34 - Diversité des Procaryotes oxydant l'ammonium, Bactéries (AOB) et Archées (AOA) en août et décembre. Le nombre d'UTO est représenté sous forme de diagramme, avec l'échelle à gauche, et la similarité sous forme de dendrogramme, avec l'échelle à droite. ....	115
Figure 35 - Map of the Seine River around Paris with sampling sites used in this study. Upstream to downstream; Choisy (Cho) is located upstream of Paris, the Seine Amont WWTP outlets (SAM), Charenton (Cha) located along the Marne River upstream of Paris, Asnière (Asn), the Seine Aval WWTP outlets (SAV), Conflans/Seine (Cos), Poissy (Poi) and Méricourt (Mer) are located along the Seine River. ....	127
Figure 36 - Concentrations of the different dissolved nitrogen species, nitrite, ammonium and nitrate ( $\mu\text{M}$ ), suspended particulate matter (SPM in $\text{mg.l}^{-1}$ ), pH, and dissolved organic carbon (DOC in ppm) along the Seine River (monthly annual sampling, March 2012-February 2013). The stations are indicated from left to right (see Fig.35); Seine Amont (SAM), Asnières (Asn) Seine Aval (SAV), Poissy (Poi). The boxes indicate the median with the 1st and 3rd quartiles as the boundaries of the box. The whiskers represent the 5th and 95th percentile, and the dots represent outlying data observed. For more detailed information regarding the different environmental parameters, see Table 9 .....	132

Figure 37 - Variation in the total Bacterial, archaeal, AOB, AOA, Nitrobacter and Nitrospira index numbers (gene copies g SPM-1) along the Seine River and two of its WWTP. Note the difference in scale for the copy numbers between bacteria/ archaea and the 4 groups of nitrifiers. Median gene copy numbers are indicated by boxplots with the 1st and 3rd quartiles as the boundaries of the box. Whiskers represent the 5th and 95th percentile, with the dots represent outliers. For more detailed information regarding the different nitrifier groups see Table 10. As seen in Figure 36, SPM are present in similar concentrations in the Seine River and the WWTP effluents, between 15 and 25 mg/L ..... 134

Figure 38 - Principal Component Analysis (PCA) bi-plot of the abundance of the different nitrifying groups (AOB, AOA, Nitrobacter spp and Nitrospira spp) and general Bacteria and Archaea for August and December 2012. The two principal components explain 88 and 95 % of the variance for respectively Asnières and Poissy. The contribution of the different microbial groups is represented by the length and angle to the PCA axes. Vectors pointing in the same directions indicate a positive correlation, whereas those in opposite direction indicate a negative correlation. Perpendicular vectors indicate no relation at all... 136

Figure 39 - Canonical Correspondence Analysis (CCA) ordination plot of the qPCR-estimated abundance for amoA (AOA and AOB), NxrA (Nitrobacter) 16s (Nitrospira, Bacteria, Archaea) in red and environmental data in blue. The contribution of the different environmental variables is represented by the length and angle to the CCA axes. Vectors pointing in the same directions indicate a positive correlation, whereas those in opposite direction indicate a negative correlation. Perpendicular vectors indicate no relation at all... 137

Figure 40 - Total abundance of the nitrifiers' genes in copy per g of dry SPM (mean and standard deviation) and the relative contributions of the different nitrifying groups in the effluents of the WWTP SAV and SAM (WWTP) and Seine River water Asnières and Poissy (Seine River). ..... 138

Figure 41 - Comparison between nitrite oxidation rates in Seine River water and in synthetic medium. .... 153

Figure 42 - Comparison of the quantification of Nitrobacter using either the 16S rDNA gene or the NxrA gene in the WWTP outlets and the Seine River water. The plain line represent the equation  $Y=1x$  ..... 154

Figure 43 - Influence des STEP de Paris sur les communautés impliquées dans la dynamique du nitrite dans la Seine. Bilan de la colonne d'eau en haut, et du sédiment en bas de la figure.....	164
---	-----

## 8 Table des Tableaux

---





Tableau 1 - Liste des amorces utilisées en PCR et qPCR .....	35
Table 2 - Environmental parameters and kinetic parameters ( <i>R<sub>max</sub></i> and <i>K<sub>M</sub></i> ) of ammonia and nitrite oxidizers in surface water collected upstream, downstream and in the effluent of the SAV WWTP, in April, November 2012 and May 2013. In light grey: CV<50%; in dark grey: CV ∈ [50-100%]; in black: CV>100%.....	84
Table 3 - Synthesis of kinetic parameters of ammonia- and nitrite-oxidizers. a Cébron (Cébron, 2004); b (Knowles et al., 1965) ; c (Helder and Devries, 1983) ; d (Hanaki et al., 1990) ; e (Focht et al., 1977); f (Martens-Habbena et al., 2009); g (Hunik et al., 1992); h (Brion and Billen, 1998); i (Hunik et al., 1993); j (Schramm et al., 1999); k (Laudelout and Vantichelen, 1960); l (Blackburne et al., 2007) ; m (Wagner et al., 2002).....	91
Table 4 - Spearman statistical correlation test between kinetic parameters of nitrite oxidizers in Seine water ( <i>R<sub>max</sub></i> and <i>K<sub>M</sub></i> ) with temperature (T) and pH .....	94
Tableau 5 - Liste des amorces utilisées pour les DGGE .....	108
Tableau 6 - Débits, concentrations en ammonium et nitrites dans la Seine à Asnières et Poissy ainsi que dans les rejets des STEP Seine Amont et Seine Aval .....	111
Table 7 - Overview of the primers used for qPCR, concentrations used, thermocycler program, reaction mix and origin of the standards.....	130
Table 8 - Comparison of nitrifying abundance obtained in the current study with those from previous studies. Numbers of nitrifiers were expressed in copies g.SPM-1, copies l-1 or copies ng DNA-1 depending on the available data in previous studies for comparison.....	140
Table 9 - Table of the environmental parameters in the Seine River at Asnières and Poissy and in the WWTP effluents for the 12 sampling in each site. ....	155
Table 10 - Table of the qPCR results (mean and standard deviation) for the four studied sites and the 12 sampling dates.....	156
Table 11 - Table comparing the qPCR amplification of plasmids in circular and linear form. ....	157